



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0142829
(43) 공개일자 2023년10월11일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7022211</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년12월02일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년06월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2021/061548</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/120010
국제공개일자 2022년06월09일</p> <p>(30) 우선권주장
63/120,356 2020년12월02일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
토마스 제퍼슨 유니버시티
미합중국 펜실베니아 19107 필라델피아 월너트 스트리트 1020</p> <p>(72) 발명자
스눅, 아담 유진
미국, 펜실베니아 19104, 애스턴, 119 마리 서클
마호니, 마이 조지아
미국, 펜실베니아 19067, 야들리, 815 허드슨 드라이브</p> <p>칼슨, 로버트 데블린
미국, 뉴저지 08080, 슈얼, 8 로링 레인</p> <p>(74) 대리인
이명진</p> |
|---|---|

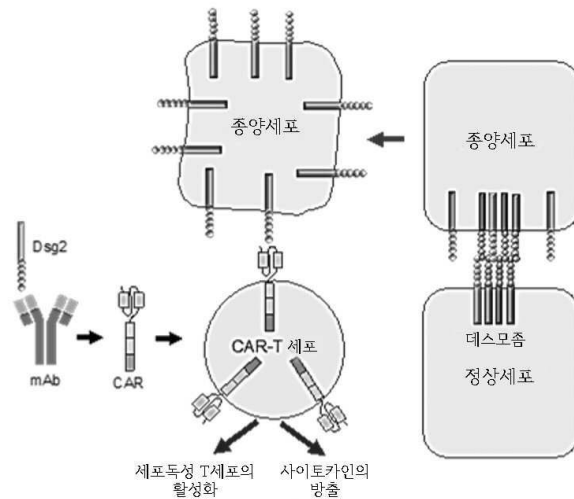
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **데스모글레인 2 지정 키메라 항원 수용체(CAR) 작제물 및 사용 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 Dsg2 결합 분자, Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자 및 이를 포함하는 조성물 및 암을 치료 또는 예방하기 위한 그의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 scFv 항체 단편을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 Dsg2, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는, 조성물:

- a) 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열;
- b) 서열번호: 4의 HC CDR2 서열;
- c) 서열번호: 6의 HC CDR3 서열;
- d) 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열;
- e) 서열번호: 12의 LC CDR2 서열;
- f) 서열번호: 14의 LC CDR3 서열;
- g) 서열번호: 18의 HC CDR1 서열;
- h) 서열번호: 20의 HC CDR2 서열;
- i) 서열번호: 22의 HC CDR3 서열;
- j) 서열번호: 26의 LC CDR1 서열;
- k) 서열번호: 28의 LC CDR2 서열; 및
- l) 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물:

- a) 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열;
- b) 서열번호: 10, 서열번호: 12 및 서열번호: 14의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열;
- c) 서열번호: 18, 서열번호: 20 및 서열번호: 22의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열;
- d) 서열번호: 26, 서열번호: 28 및 서열번호: 30의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열;
- e) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열;
- f) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열;
- g) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;

- h) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;
- i) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편; 및
- j) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, CAR은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 조성물:

- a) 서열번호: 34 및 서열번호: 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열;
- b) 서열번호: 34 및 서열번호: 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열; 및
- c) 서열번호: 34 및 서열번호: 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 보조제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 8

Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함하는 CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 scFv 항체 단편을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CDR 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는, 조성물:

- a) 서열번호: 2의 HC CDR1 서열;
- b) 서열번호: 4의 HC CDR2 서열;
- c) 서열번호: 6의 HC CDR3 서열;
- d) 서열번호: 10의 LC CDR1 서열;
- e) 서열번호: 12의 LC CDR2 서열;
- f) 서열번호: 14의 LC CDR3 서열;
- g) 서열번호: 18의 HC CDR1 서열;
- h) 서열번호: 20의 HC CDR2 서열;
- i) 서열번호: 22의 HC CDR3 서열;
- j) 서열번호: 26의 LC CDR1 서열;
- k) 서열번호: 28의 LC CDR2 서열; 및
- l) 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.

청구항 11

제10항에 있어서, 핵산 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 항

체 또는 그의 단편을 인코딩하는, 조성물:

- a) 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열;
- b) 서열번호: 10, 서열번호: 12 및 서열번호: 14의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열;
- c) 서열번호: 18, 서열번호: 20 및 서열번호: 22의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열;
- d) 서열번호: 26, 서열번호: 28 및 서열번호: 30의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열;
- e) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열;
- f) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열;
- g) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;
- h) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;
- i) 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편; 및
- j) 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편.

청구항 12

제10항에 있어서, 핵산 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 CDR을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 조성물:

- a) HC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 1의 뉴클레오티드 서열;
- b) HC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열;
- c) HC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 5의 뉴클레오티드 서열;
- d) LC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 9의 뉴클레오티드 서열;
- e) LC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 11의 뉴클레오티드 서열;
- f) LC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 13의 뉴클레오티드 서열;
- g) HC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 17의 뉴클레오티드 서열;
- h) HC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 19의 뉴클레오티드 서열;
- i) HC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 21의 뉴클레오티드 서열;
- j) LC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 25의 뉴클레오티드 서열;
- k) LC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 27의 뉴클레오티드 서열; 및
- l) LC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 29의 뉴클레오티드 서열.

청구항 13

제12항에 있어서, 핵산 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 조성물:

- a) 서열번호: 1, 서열번호: 3 및 서열번호: 5를 포함하는 뉴클레오티드 서열;
- b) 서열번호: 9, 서열번호: 11 및 서열번호: 13을 포함하는 뉴클레오티드 서열;
- c) 서열번호: 17, 서열번호: 19 및 서열번호: 21을 포함하는 뉴클레오티드 서열;
- d) 서열번호: 25, 서열번호: 27 및 서열번호: 29를 포함하는 뉴클레오티드 서열;

- e) 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열;
- f) 가변 경쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열;
- g) 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;
- h) 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열;
- i) 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편; 및
- j) 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편.

청구항 14

제8항에 있어서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 조성물.

- a) 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열;
- b) 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열; 및
- c) 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편.

청구항 15

제8항에 있어서, 핵산 분자는 발현 벡터를 포함하는, 조성물.

청구항 16

제8항에 있어서, 핵산 분자는 바이러스 입자에 혼입된 것인, 조성물.

청구항 17

제8항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 보조제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 18

제8항에 있어서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함하는 CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 단리된 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 단리된 세포는 면역 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 면역 세포는 T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, T 조절 세포, 자연 살해 T 세포, 점막 연관된 불변 T 세포(MAIT), $\gamma \delta$ T 세포, TCR-형질전환 T 세포, 보편적인 사이토카인 매개 사멸을 위해 제지정된 T-세포 (TRUCK), 중앙 침윤 T 세포(TIL), 및 CAR-T 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 면역세포는 자연 살해 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 22

필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법으로서, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 질환 또는 장애는 암, 또는 암과 연관된 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 암은 부신피질 암종(ACC); 방광 요상피 암종(BLCA); 유방 침습성 암종(BRCA); 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종(CESC); 담관 암종(CHOL); 결장 선암종(COAD); 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBC); 식도 암종(ESCA); 다형상 교모세포종(GBM); 두경부 편평 세포 암종(HNSC); 신장 험색소(KICH); 신장 신장 맑은 세포 암종(KIRC); 신장 신장 유두상 세포 암종(KIRP); 급성 골수성 백혈병(LAML); 뇌 저급 신경 교종(LGG); 간 간세포 암종(LIHC); 폐 선암종(LUAD); 폐 편평 세포 암종(LUSC); 중피종(MESO); 다발성 골수종(MM); 난소 장액성 낭상암종(OV); 췌장 선암종(PAAD); 크롬친화세포종 및 부신경절종(PCPG); 전립선 선암종(PRAD); 직장 선암종(READ); 육종(SARC); 피부 흑색종(SKCM); 위 선암종(STAD); 고환 생식 세포 종양(TGCT); 갑상선 암종(THCA); 흉선종(THYM); 자궁 체부 자궁내막암종(UCEC); 자궁 암육종(UCS); 및 포도막 흑색종(UVM)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 12월 2일에 출원된 미국 가출원 제63/120,356에 대한 우선권을 주장하며, 이는 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0003] 암 클리닉에 진입하는 가장 강력하고 성공적인 새로운 요법 중 하나는 CAR-T 세포 요법이다(Brudno 및 Kochenderfer, 2018, Nat Rev Clin Oncol, 15(1):31-46). 이 접근법에서는 환자 T 세포를 수집하고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전자적으로 변형하고, 매우 많은 수로 확대하고, 환자에게 투여한다. 놀랍게도 CAR-T 세포 요법은 불응성 진행성 백혈병 환자의 ~75%에 효과적이어서, 세 가지 FDA 승인 CAR-T 세포 요법이 나왔다(Brudno 및 Kochenderfer, 2018, Nat Rev Clin Oncol, 15(1): 31-46). 그러나 이 치료법은 고형암(폐암, 결장직장암, 췌장암, 유방암 등)에는 성공하지 못했으며, 이는 환자, 종양 및 면역 인자뿐만 아니라 각 질환에 적합한 항원 표적의 필요성을 반영한다(Baybutt 등, 2019, Clin Pharmacol Ther, 105(1):71-78). 현재 CAR-T 세포 요법은 전형적으로 암이 유래한 세포에서 발현되는 조직 특이적 표면 수용체를 표적으로 한다. 그에 반해서, 이론에 얽매이지 않고, 세포 사이의 접합(부착 접합, 밀착 연결, 데스모솜 등)의 변화를 통한 고형암의 전형적인 조직 해체는 암 표면의 새로운 요법 표적을 밝혀내지만 정상 세포는 그렇지 않아, 보편적인 표적을 통해 거의 모든 고형암 유형의 치료가 가능하다. 또한, 환자 T 세포가 세포 요법의 주요 공급원이었지만 공여자 유래 NK 세포는 환자 유래 물질이 필요하지 않은 "기성품(off-the-shelf)" 접근 방식일 수 있다. 거의 보편적인 표적과 세포의 공여자 유래 세포 공급원과의 조합은 미국에서 매년 암으로 사망하는 약 100만명을 위해 안전하고 효과적이며 대량 생산이 가능하고 저렴한 보편적인 "기성품" CAR-NK 세포 요법을 만들 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서 암을 포함하는 질환 및 장애를 치료 및 예방하기 위한 조성물 및 방법이 당업계에 필요하다. 본 발명은 당업계에서 이러한 미충족 요구를 다룬다.

과제의 해결 수단

[0005] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편에 관한 것이다. 일 구현예에서, 항

체는 하기 중 적어도 하나를 포함한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 서열번호: 14의 LC CDR3 서열, 서열번호: 18의 HC CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 LC CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.

[0006] 일 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 scFv 항체 단편을 포함한다.

[0007] 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 10, 서열번호: 12 및 서열번호: 14의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 18, 서열번호: 20 및 서열번호: 22의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 26, 서열번호: 28 및 서열번호: 30의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 8 또는 서열번호: 24의 가변 중쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 가변 경쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 8 및 서열번호: 24의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다. 한 구현예에서, 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 가변 경쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다.

[0008] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 scFv 항체 단편을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 도메인은 Dsg2, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 포함한다.

[0009] 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 10, 서열번호: 12 및 서열번호: 14의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 18, 서열번호: 20 및 서열번호: 22의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 26, 서열번호: 28 및 서열번호: 30의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 8 또는 서열번호: 24의 가변 중쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 가변 경쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 8 및 서열번호: 24의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 가변 경쇄 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함하는 Dsg2 결합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 34 또는 서열번호: 36에 제시된 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 34 또는 서열번호: 36에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR은 서열번호: 34 또는 서열번호: 36의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편 서열을 포함한다.

[0010] 일 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제, 보조제 또는 그의 조합을 추가로 포함한다.

[0011] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 하기 중 적어도 하나를 포함하는 항체를 인코딩한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 서열번호: 14의 LC CDR3 서열, 서열번호: 18의 HC CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 LC CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.

[0012] 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 10, 서열번호: 12 및 서열번호: 14의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호:

18, 서열번호: 20 및 서열번호: 22의 CDR 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 26, 서열번호: 28 및 서열번호: 30의 CDR 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 8 및 서열번호: 24로 이루어진 균으로부터 선택된 가변 중쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 16 및 서열번호: 32로 이루어진 균으로부터 선택된 가변 경쇄 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 8 또는 서열번호: 24의 가변 중쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 가변 경쇄 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 항체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 서열번호: 8, 서열번호: 24, 서열번호: 16 또는 서열번호: 32의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 인코딩한다.

[0013] 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산은 하기 중 적어도 하나를 포함한다: HC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 1의 뉴클레오티드 서열; HC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열; HC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 5의 뉴클레오티드 서열; LC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 9의 뉴클레오티드 서열; LC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 11의 뉴클레오티드 서열; LC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 13의 뉴클레오티드 서열; HC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 17의 뉴클레오티드 서열; HC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 19의 뉴클레오티드 서열; HC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 21의 뉴클레오티드 서열; LC CDR1을 인코딩하는 서열번호: 25의 뉴클레오티드 서열; LC CDR2를 인코딩하는 서열번호: 27의 뉴클레오티드 서열; 및 LC CDR3을 인코딩하는 서열번호: 29의 뉴클레오티드 서열.

[0014] 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 1, 서열번호: 3 및 서열번호: 5의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 경쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 9, 서열번호: 11 및 서열번호: 13의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 17, 서열번호: 19 및 서열번호: 21의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 25, 서열번호: 27 및 서열번호: 29의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 경쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 7 및 서열번호: 23로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다.

[0015] 일 구현예에서, Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 scFv 항체 단편을 포함하는 CAR 분자를 인코딩한다.

[0016] 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 1, 서열번호: 3 및 서열번호: 5의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 경쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 9, 서열번호: 11 및 서열번호: 13의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 17, 서열번호: 19 및 서열번호: 21의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 25, 서열번호: 27 및 서열번호: 29의 CDR 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 중쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 가변 경쇄 서열을 인코딩하는, 서열번호: 15 및 서열번호: 31로

이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 7 및 서열번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 15 및 서열번호: 31로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, CAR을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 33 및 서열번호: 35로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 80%를 포함하는 단편을 포함한다.

- [0017] 일 구현예에서, 핵산 분자는 발현 벡터를 포함한다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 바이러스 입자에 혼입된다.
- [0018] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자 또는 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는 CAR 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 일 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제, 보조제 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0020] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자 또는 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는 CAR 분자를 발현하는 단리된 세포에 관한 것이다.
- [0021] 일 구현예에서, 세포는 면역 세포이다. 일 구현예에서, 면역 세포는 T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, T 조절 세포, 자연 살해 T 세포, 점막 연관된 불변 T 세포(MAIT), γ δ T 세포, TCR-형질전환 T 세포, 보편적인 사이토카인 매개 사멸을 위해 재지정된 T-세포(TRUCK), 종양 침윤 T 세포(TIL), 또는 CAR-T 세포이다. 일 구현예에서, 면역 세포는 자연 살해(NK) 세포이다.
- [0022] 일 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 단리된 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0023] 일 구현예에서, 질환 또는 장애는 암, 또는 암과 연관된 질환 또는 장애이다.
- [0024] 일 구현예에서, 암은 부신피질 암종(ACC); 방광 요상피 암종(BLCA); 유방 침습성 암종(BRCA); 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종(CESC); 담관 암종(CHOL); 결장 선암종(COAD); 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBC); 식도 암종(ESCA); 다형상 교모세포종(GBM); 두경부 편평 세포 암종(HNSC); 신장 헵삭소(KICH); 신장 신장 맑은 세포 암종(KIRC); 신장 신장 유두상 세포 암종(KIRP); 급성 골수성 백혈병(LAML); 뇌 저급 신경교종(LGG); 간 간세포 암종(LIHC); 폐 선암종(LUAD); 폐 편평 세포 암종(LUSC); 중피종(MESO); 다발성 골수종(MM); 난소 장액성 낭상암종(OV); 췌장 선암종(PAAD); 크롬친화세포종 및 부신경절종(PCPG); 전립선 선암종(PRAD); 직장 선암종(READ); 육종(SARC); 피부 흑색종(SKCM); 위 선암종(STAD); 고환 생식 세포 종양(TGCT); 갑상선 암종(THCA); 흉선종(THYM); 자궁 체부 자궁내막암종(UCEC); 자궁 암육종(UCS); 또는 포도막 흑색종(UVM)이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 발명의 구현예 대한 다음의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명은 도면에 도시된 구현예의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

도 1은 입양 T 세포 면역요법에서 Dsg2 특이적 CAR-T 세포를 사용하기 위한 전략 및 근거의 개략도이다. T 세포는 Dsg2 결합 및 T 세포 활성화 도메인(CAR)의 키메라를 발현하도록 조작된다. 정상 세포에서, Dsg2는 데스모솜 복합체에 제한되며 CAR-T 세포에 접근할 수 없다. 종양 세포는 CAR-T 세포가 표적으로 삼을 수 있는 높은 수준

의 테스모솜이 없는 Dsg2를 발현한다.

도 2a 내지 도 2e는 Dsg2가 대부분의 고형암에서 과발현되고 불량한 예후와 상관관계가 있음을 입증하는 예시적인 실험 결과를 도시한다. 도 2a는 종양이(인간 단백질 아틀라스로부터) 중간 또는 높은 Dsg2 단백질 발현을 입증하는 다양한 암 환자의 일부를 도시한다. 도 2b는(인간 단백질 아틀라스)로부터 암 전체에서 풍부한 발현을 보여주는 Dsg2에 대해 염색된 전립선암, 췌장암, 결장직장암 및 폐암의 대표적인 면역조직화학을 도시한다. 도 2c는 mRNA 정량화(TCGA 및 GTEx 프로젝트 데이터를 사용하여 GEPIA2에 의해 컴파일됨)에 의한 대표적인 암(전립선암, 췌장암, 결장직장암 및 폐암)의 상향조절을 도시한다. 도 2d 및 도 2e는 각각 Dsg2 발현에 의한 췌장암 및 폐암 환자의 5년 생존 확률을 도시한다(TCGA 및 GTEx 프로젝트 데이터를 사용하여 GEPIA2로 컴파일됨).

도 3a 내지 도 3c는 Dsg2 mAb가 종양 발생을 차단한다는 것을 입증하는 예시적인 실험 결과를 도시한다. 도 3a는 -GFP 또는 -Dsg2/GFP를 발현하는 A431 cSCC 세포를 사용하여 SCID 마우스에서 이종이식 종양이 확립되었음을 입증하는 데이터를 도시한다. 다음 공식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다: $V=0.5(L^*W^2)$. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표현된다. 2-웨이 반복 측정 ANOVA. * $P<0.05$. 도 3b 및 도 3c는 이종이식 종양이 A431 cSCC 세포를 사용하여 확립되었음을 입증하는 데이터를 도시한다. 1주 후, 마우스를 매주 2회 5mg/kg의 mAb 6D8(도 3b) 또는 mAb 10D2(도 3c)로 처리하였다.

도 4는 일차 인간 SCC 세포의 종양 이종이식편이 Dsg2를 발현한다는 것을 도시하는 대표적인 이미지를 도시한다. SCID Balb/c 마우스의 옆구리에 $1-4 \times 10^6$ 일차 인간 SCC 종양 세포를 피하 주사하였다. 이종이식 종양을 절제하고 마우스 표피(왼쪽) 및 종양 덩어리(오른쪽)에서 Dsg2에 대해 면역염색하였다. 피부에서 Dsg2의 발현이 거의 또는 전혀 검출되지 않았다.

도 5a 내지 도 5c는 Dsg2 특이적 단클론성 항체(mAb)를 입증하는 예시적인 실험으로부터의 결과를 도시한다. 도 5a는 Dsg2 도메인의 개략도를 도시한다. P, Pro-지역; EC, 세포외 도메인; TM, 막횡단; IA, 세포내 고착, ICS, 세포내 카드헤린 세그먼트; LD, 링커 도메인; RUD, 반복 단위 도메인; TD, 말단 도메인. 10D2는 EC1을 인식하는 반면, 6D8은 EC4를 인식한다. 도 5b 및 도 5c의 경우, A431 SCC를 mAb 6D8 및 10D2로 면역블로팅(도 5b) 또는 면역염색(도 5c)하였다.

도 6은 Dsg2(n=20)를 녹아웃시키기 위한 4개의 CRISPR/Cas9 작제물의 개별 클론을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다.

도 7은 선택된 고형암에서의 Dsg2 발현을 도시한다. RNAseq 데이터는 TCGA 및 GTEx 프로젝트에서 수집되었으며 GEPIA(gepia.cancer-pku.cn)를 사용하여 분석 및 표시되었다. ACC, 부신피질 암종; BLCA, 방광 요상피 암종; BRCA, 유방 침습성 암종; CESC, 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종; CHOL, 담관 암종; COAD, 결장 선암종; DLBC, 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종; ESCA, 식도 암종; GBM, 다형성 교모세포종; HNSC, 두경부 편평 세포 암종; KICH, 신장 협색소; KIRC, 신장 신장 맑은 세포 암종; KIRP, 신장 신장 유두상 세포 암종; LAML, 급성 골수성 백혈병; LGG, 뇌 저급 신경교종; LIHC, 간 간세포 암종; LUAD, 폐 선암종; LUSC, 폐 편평 세포 암종; MESO, 중피종; OV, 난소 장액성 낭성암종; PAAD, 췌장 선암종; PCPG, 크립친화세포종 및 부신경절종; PRAD, 전립선 선암종; READ, 직장 선암종; SARC, 육종; SKCM, 피부 흑색종; STAD, 위 선암종; TGCT, 고환 생식 세포 종양; THCA, 갑상선 암종; THYM, 흉선종; UCEC, 자궁 체부 자궁내막암종; UCS, 자궁 암육종; UVM, 포도막 흑색종.

도 8은 Dsg2 표적화를 위한 "기회 창"을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다. 예비 데이터를 기반으로, 가설은 정상 세포에서 Dsg2가 테스모솜 복합체에 제한되며 CAR-T 또는 CAR-NK 세포에 접근할 수 없다는 것이다. 그에 반해서, 종양 세포는 CAR-T/NK 세포에 의해 표적화될 수 있는 높은 수준의 비-테스모솜 연관 Dsg2를 발현한다.

도 9는 Dsg2-mAb 유래 scFv와 조합된 3세대 CAR 작제물 백본을 도시한다. 후속 도면에서 Dsg2 항원 자극 및 이펙터 기능을 테스트하기 위해 마우스 CD8+ T 세포에 통합된 CAR의 현재 반복. 왼쪽부터 오른쪽으로: (mBIP-SS) 뮤린 ER 샤페론 및 신호 서열, (5xHIS) 펜타-히스티딘 반복체, (VL) Dsg2 mAb 유래된 가변 경쇄, (링커) scFv(G4S)4 유연성 링커, (VH) Dsg2 mAb 유래된 가변 중쇄, (CD8 힌지) 비-신호전달 세포의 유연성 모듈, (CD28 TM) CD28 공동자극 막횡단 도메인, (CD28 ICD) CD28 공동자극 세포내 신호전달 도메인, (4-1BB ICD) CD137 공동자극 세포내 신호전달 도메인(CD3 ζ) 세포내 신호전달 도메인.

도 10a 및 도 10b는 항원 자극 Dsg2 특이적 CAR-T 세포의 세포내 사이토카인 염색을 입증하는 예시적인 실험으

로부터의 결과를 도시한다. IFN γ 및 TNF α 사이토카인(항원 검출 및 T-세포 활성화 마커)에 대해 이중 양성인 생 CD8+, GFP+ T 세포의 백분율. 도 10a는 무 PMA/이오노마이신 음성 대조군, 비특이적 단백질(BSA) 자극 대조군, 제조합 huma Dsg2 단백질, 항-펜타-HIS 항체(CAR 작제물 특이적 양성 대조군), PMA/이오노마이신(항원/CAR-비의존적 양성 대조군)을 도시한다. 도 10b는 인간 A431 cSCC 세포주 변이체를 도시한다: GFP가 있는 A431 모체, Dsg2의 팔미토일화 돌연변이체가 있는 A431, Dsg2 과발현이 있는 A431, A431 Dsg2 CRISPR/Cas9 녹아웃, (DLD-1) 인간 결장직장 선암종 세포주, 비 특이적 PMA/이오노마이신 양성 대조군.

도 11a 및 도 11b는 Dsg2-녹아웃 SCC 세포가 아닌 표면 Dsg2를 발현하는 SCC 세포주의 CAR-T 세포 사멸을 입증하는 예시적인 실험으로부터의 결과를 도시한다. xCELLigence 실시간 세포 분석(RTCA)은 A431 SCC 모 세포(도 11a)에서 Dsg2 특이적 CAR-T 세포 독성을 입증하지만 A431 Dsg2 CRISPR/Cas9 녹아웃 세포(도 11b)에서는 그렇지 않다.

도 12a 내지 도 12c는 A431 cSCC 종양을 치료하는데 있어서 생체내 CAR-T 세포 효능을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다. 대조군 처리된 종양 진행 및 Dsg2 CAR-T 처리된 종양 퇴행을 입증하는 생체내 생물발광 이미지(도 12a) 및 종양 크기 측정(도 12b). 생존 분석은 대조군 처리된 동물에서 신속하고 완전한 사망률 및 Dsg2 CAR-T 처리된 동물의 거의 100% 치유를 입증한다(도 12c).

도 13a 내지 도 13c는 Dsg2 지정 CAR-T 세포의 생체내 지속성을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다. Dsg2 녹아웃 A431 세포가 아닌 A431 세포로 제2 도전에 대한 이전에 처리된 마우스(도 12에서 초기 종양 도전 후 100일)의 생체내 내성(도 13a). 골수 및 비장의 유동 세포측정 분석은 기억 및 이펙터 표현형(도 13c)을 갖는 CAR+(GFP+) T 세포(도 13b)의 지속성을 입증한다.

도 14a는 6D8 및 10D2 scFv로 생산된 Dsg2 CAR-T 세포에 의한 A431 SCC 세포의 CAR-T 세포 사멸을 입증하는 예시적인 실험을 도시한다. 형질도입되지 않은(CAR 없음) 및 1D3 CAR 형질도입된 T 세포는 음성 대조군이다.

도 14b는 마우스에서 10D2 Dsg2 CAR-T 세포의 안전성을 입증하는 예시적인 실험을 도시한다. 체중 분석은 10D2 scFv로부터 생산된 Dsg2 CAR-T 세포를 받은 마우스의 체중에 변화가 없음을 입증한다.

도 14c 내지 도 14e는 인간 Dsg2 이식유전자를 발현하는 마우스 모델(hDsg2^{Tg} 마우스) 및 이들 마우스에서 CAR-T 세포의 안전성을 검증하는 예시적인 실험을 도시한다. hDsg2^{Tg} 마우스는 대부분의 조직에서 Dsg2를 발현하며, 인간을 모방한다(선택된 조직은 도 14c에 도시됨). 더욱이, hDsg2^{Tg} 마우스로부터 단리된 각질형성세포는 접시에서 Dsg2 CAR-T 세포를 활성화시키고(도 14d), 이는 테스트모즘의 파괴를 반영한다(도 8). 조직에서 hDsg2의 강력한 발현에도 불구하고(도 14c), hDsg2^{Tg} 마우스에 투여된 10D8 및 6D8 CAR-T 세포는 독성을 나타내지 않았다(도 14e).

도 15a 및 도 15b는 다양한 고품암 유형에 대한 시험관내 CAR-T 세포 효능을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다. 편평 세포 암종(A431), 결장직장(HT-29, Caco-2, SW480, T84, 및 DLD-1), 폐(A549), 췌장(PANC-1), 및 흑색종(TJU-UM001) 암을 포함하는 다양한 인간 암 유형을 6D8 Dsg2 CAR-T 세포와 함께 인큐베이션하고 이펙터 사이토카인(IFN γ 및 TNF α) 생산을 유동 세포측정법으로 정량화하였다(도 15a). "항원 없음" 및 "PMA/IONO"는 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 편평 세포 암종(A431), 결장직장(DLD-1 및 T84), 폐(A549), 및 췌장(BxPC-3, PANC-1, MIA PaCa-2, 및 AsPC-1) 암을 포함한 다양한 인간 암 유형을 6D8 Dsg2 CAR-T 세포와 함께 인큐베이션하고 그들의 용해를 RTCA에 의해 정량화하였다(도 15b). Dsg2 녹아웃 A431은 음성 대조군이였다. 테스트된 모든 라인은 Dsg2가 CRISPR-Cas9(Dsg2-KO)로 결실된 세포를 제외하고 이펙터 사이토카인 생산(도 15a) 및 용해(도 15b)를 초래하였다.

도 16은 DLD-1 결장직장 종양 치료에서 생체내 CAR-T 세포 효능을 입증하는 예시적인 실험의 결과를 도시한다. 종양 성장 17일차에 투여된 6D8 Dsg2 CAR-T 세포에 의한 DLD-1 종양의 신속하고 완전한 제거를 입증하는 생체내 종양 크기 측정(도 16).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 항체, 그의 단편, 이의 변이체와 같은 Dsg2 결합 분자를 포함하는 조성물 및 이를 인코딩하는 핵산 분자, 및 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 및 장애를 진단 또는 치료하기 위한 사용 방법에 관한 것이다.

[0027] 일부 구현예에서, 본 발명은 Dsg2 결합 분자, 이의 단편, 이의 변이체를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 분

자; 또는 이를 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.

- [0028] 일부 구현예에서, 본 발명은 Dsg2 결합 분자, 그의 단편 또는 그의 변이체를 포함하는 CAR 분자를 발현하는 면역 세포에 관한 것이다.
- [0029] 일부 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 대상체에게 Dsg2 결합 분자, 그의 단편, 그의 변이체, 그를 인코딩하는 핵산 분자, Dsg2 결합 분자, 그의 단편, 그의 변이체를 포함하는 CAR 분자, 또는 그를 인코딩하는 핵산 분자, 또는 Dsg2 결합 분자, 그의 단편, 또는 그의 변이체를 포함하는 CAR 분자를 발현하는 면역 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0030] 일 구현예에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일 구현예에서, 암은 고형 종양이다. 일 구현예에서, 암은 부신피질 암종(ACC); 방광 요상피 암종(BLCA); 유방 침습성 암종(BRCA); 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종(CESC); 담관 암종(CHOL); 결장 선암종(COAD); 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBC); 식도 암종(ESCA); 다형상 교모세포종(GBM); 두경부 편평 세포 암종(HNSC); 신장 험색소(KICH); 신장 신장 맑은 세포 암종(KIRC); 신장 신장 유두상 세포 암종(KIRP); 급성 골수성 백혈병(LAML); 뇌 저급 신경교종(LGG); 간 간세포 암종(LIHC); 폐 선암종(LUAD); 폐 편평 세포 암종(LUSC); 중피종(MESO); 다발성 골수종(MM); 난소 장액성 낭샘암종(OV); 췌장 선암종(PAAD); 크롬친화세포종 및 부신절종(PCPG); 전립선 선암종(PRAD); 직장 선암종(READ); 육종(SARC); 피부 흑색종(SKCM); 위 선암종(STAD); 고환 생식 세포 종양(TGCT); 갑상선 암종(THCA); 흉선종(THYM); 자궁 체부 자궁내막암종(UCEC); 자궁 암육종(UCS); 및 포도막 흑색종(UVM)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 정의
- [0032] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 관련 기술 분야의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 다음 용어 각각은 이 섹션에서 연관된 의미를 갖는다.
- [0034] 관사 "a" 및 "an"은 본 명세서에서 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하는데 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과 요소의 요소를 의미한다.
- [0035] 양, 시간적 지속시간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약"은 명시된 값으로부터 ±20%, ±10%, ±5%, ±1%, 또는 ±0.1%의 변동을 포괄하는 것을 의미하며, 이러한 변동은 개시된 방법을 수행하는 데 적합하다.
- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명의 항체는 예를 들어, 다클론성 항체, 단클론성 항체, Fv, Fab 및 F(ab)₂, 뿐만 아니라 단쇄 항체 및 인간화 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다(Harlow 등, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow 등, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston 등, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird 등, 1988, Science 242:423-426).
- [0037] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 지칭하고 온전한 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "항체 중쇄"라는 용어는 모든 항체 분자에 자연 발생 형태로 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 큰 것을 지칭한다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "항체 경쇄"라는 용어는 모든 항체 분자에 자연 발생 형태로 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다. κ 및 λ 경쇄는 두 가지 주요 항체 경쇄 아이소타입을 지칭한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "합성 항체"란 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예를 들어 박테리오파지에 의해 발현되는 항체를 의미한다. 이 용어는 또한 항체를 인코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질, 또는 항체를 특징하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 이용가능하고 당업계에 잘 알려진 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기

술을 사용하여 수득된다. 상기 용어는 또한 항체를 인코딩하는 RNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 한다. RNA 분자는 항체 단백질, 또는 항체를 지정하는 아미노산 서열을 발현하며, 여기서 RNA는 DNA(합성 또는 클로닝)를 전사하거나 이용가능하고 당업계에 잘 알려진 다른 기술에 의해 얻어진다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 용어 "항원" 또는 "Ag"는 적응 면역 반응을 유발하는 분자로 정의된다. 이 면역 반응은 항체 생산, 또는 특정 면역학적 적격 세포의 활성화 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 당업자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 모든 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA 또는 RNA에서 유도될 수 있다. 당업자는 뉴클레오티드 서열 또는 부분적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 모든 DNA 또는 RNA가 용어가 본 명세서에 사용되는 바와 같이 적응 면역 반응을 유도하여 "항원"을 인코딩하는 단백질을 인코딩함을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해 서만 인코딩될 필요가 없음을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 초과 유전자의 부분적인 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는다는 것과 이러한 뉴클레오티드 서열이 원하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것은 명백하다. 더욱이, 당업자는 항원이 "유전자"에 의해 인코딩될 필요가 전혀 없음을 이해할 것이다. 항원이 합성되어 생성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유도될 수 있다는 것은 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 명세서에 사용되는 용어 "보조제"는 항원 특이적 적응 면역 반응을 강화시키는 임의의 분자로 정의된다.

[0043] "질환"은 동물의 항상성을 유지할 수 없는 동물의 건강 상태이며, 여기서 질환이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속 악화된다. 그에 반해서, 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있지만 동물의 건강 상태가 장애가 없을 때보다 덜 유리한 건강 상태이다. 치료하지 않고 방치하면 장애가 반드시 동물의 건강 상태를 추가로 감소시키는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서에서 사용되는 "유효량"은 치료적 또는 예방적 이점을 제공하는 양을 의미한다.

[0045] "인코딩(encoding)"은 뉴클레오티드의 한정된 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 한정된 서열을 갖는 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 유전자, cDNA 또는 mRNA 내의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유한 특성 및 그로부터 생성된 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서 해당 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우 유전자는 단백질을 인코딩한다. 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에 제공되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 단백질 또는 그 유전자의 다른 생성물 또는 cDNA를 인코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.

[0046] "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스템 작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 다른 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관 내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 재조합체 폴리뉴클레오티드를 혼입하는 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드 또는 리포솜에 함유됨) RNA, 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 연관 바이러스)과 같은 모든 당해 분야에서 알려진 것들을 함유한다.

[0047] "면역원"은 면역 반응을 일으키기 위해 체내에 도입되는 모든 물질을 의미한다. 그 물질은 단백질과 같은 물리적 분자이거나 DNA, mRNA 또는 바이러스와 같은 벡터에 의해 인코딩될 수 있다.

[0048] 본 명세서에 사용되는 용어 "면역 반응"은 면역 세포를 자극 및/또는 활성화시키는 검출가능한 결과를 의미한다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 용어 "면역 반응"은 T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및/또는 항원 제시 세포(APC)에서 이펙터 기능의 활성화 및/또는 발동을 초래하는 과정을 의미한다. 따라서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 면역 반응은 헬퍼 T 세포 또는 세포독성 T 세포 반응의 임의의 검출가능한 항원 특이적 또는 동종이계 활성화, 항체 생산, 알리지 반응의 T 세포 매개 활성화, 대식세포 침윤, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 용어 "면역 세포"는 면역 반응의 마운팅에 관여하는 임의의 세포를 의미한다. 그러한 세포는 T 세포, B 세포, NK 세포, 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포 및 대식세포), 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0051] "단리된"은 자연 상태에서 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에서 자연적으로 존재하

는 핵산 또는 펩티드는 "단리"되지 않지만, 동일한 핵산 또는 펩티드는 자연적 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 단리되어 "단리"된다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다.

[0052] 본 발명의 맥락에서, 일반적으로 발생하는 뉴클레오시드(N-글리코시드 연결을 통해 리보스 또는 데옥시리보스 당에 결합된 핵염기)에 대한 다음 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시티딘을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, 그리고 "U"는 우리딘을 지칭한다.

[0053] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이라는 어구는 또한 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 함유할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절하는"은 치료 또는 화합물이 없는 대상체의 반응 수준과 비교하고/하거나 달리 동일하지만 치료받지 않은 대상체의 반응 수준과 비교하여 대상체에서 반응 수준의 검출가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 이 용어는 자연 신호 또는 반응을 교란 및/또는 영향을 미침으로써 대상체에서 유의한 치료 반응을 매개하는 것을 포괄한다.

[0055] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 시험관 내 또는 인시투(in situ) 임의의 동물 또는 그의 세포를 지칭한다. 일부 비-제한적 구현예에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다.

[0056] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 사슬로 정의된다. 또한 핵산은 뉴클레오티드의 중합체이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 상호교환가능하다. 당업자는 핵산이 단량체 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있는 폴리뉴클레오티드라는 일반적인 지식을 가지고 있다. 단량체 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본 명세서에 사용된 폴리뉴클레오티드는 비-제한적으로 재조합 수단, 즉 통상의 클로닝 기술 및 PCR™ 등을 사용한 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터의 핵산 서열의 클로닝, 및 합성 수단을 포함한 관련 기술분야에서 이용가능한 임의의 수단에 의해 취득되는 모든 핵산 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0057] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 또는 펩티드의 서열을 함유할 수 있는 아미노산의 최대 수에는 제한이 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 이 용어는 예를 들어 당업계에서 일반적으로 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로 지칭되는 단쇄 및 당업계에서 일반적으로 단백질로 지칭되는 보다 긴 사슬을 지칭하며, 이들 중 많은 유형이 있다. "폴리펩티드"는 그 중에서도 예를 들어, 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0058] 항체와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합한다"는 특정 항원을 인식하지만 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체를 의미한다. 예를 들어, 한 종의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 하나 이상의 다른 종의 항원에도 결합할 수 있다. 교차종 반응성 자체가 항체의 분류를 특이적으로 변경하지는 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 다른 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나 이러한 교차 반응성 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경하지는 않는다. 일부 경우에, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 상호작용이 화학종에 대한 특정 구조(예를 들어 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하기 위해 항체, 단백질 또는 펩티드와 제2의 화학종과의 상호작용과 관련하여 사용될 수 있고; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A를 함유하는 분자(또는 유리, 표지되지 않은 A)의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질환 또는 장애 상태의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 억제, 축소, 관해 또는 박멸에 의해 얻어진다.

[0060] 용어 "치료 유효량"은 연구원, 의사, 또는 다른 임상가가 찾고 있는 조직, 시스템 또는 대상체의 생물학적 또는 의료 반응을 유도할 대상 화합물의 양을 지칭한다. 용어 "치료 유효량"이 투여될 때 치료되는 장애 또

는 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상의 발생을 예방하거나 어느 정도 완화시키기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료 유효량은 화합물, 치료 대상체의 질환 및 이의 중증도 및 연령, 체중 등에 따라 달라질 것이다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 용어로서 질환을 "치료한다"는 것은 대상체가 경험하는 질환 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0062] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상 세포 및 그 자손을 포함한다.

[0063] 용어 "백터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 백터가 당업계에 알려져 있다. 따라서, "백터"라는 용어는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 예를 들어 폴리라이신 화합물, 리포솜 등과 같이 핵산을 세포로 전달하는 것을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 백터의 예는 아데노바이러스 백터, 아데노 연관 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0064] 범위: 본 개시내 전반에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양태가 범위 포맷으로 제시될 수 있다. 범위 포맷의 설명은 단지 편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위의 설명은 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라 그 범위 내의 개별 수치로 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1에서 6과 같은 범위의 설명은 구체적으로 개시된 하위범위 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 뿐만 아니라 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 이것은 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0065] 설명

[0066] 본 발명은 부분적으로 암성 세포에서 고도로 발현되는 Dsg2에 결합하기 위한 조성물의 개발에 기초한다. 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 조성물은 면역 반응을 유도하는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신)이다. 일 구현예에서, 조성물은 질환 또는 장애에 대한 치료제이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 조성물은 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편이다.

[0067] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 고행암을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다: 부신피질 암종(ACC); 방광 요상피 암종(BLCA); 유방 침습성 암종(BRCA); 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종(CESC); 담관 암종(CHOL); 결장 선암종(COAD); 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBC); 식도 암종(ESCA); 다형상 교모세포종(GBM); 두경부 편평 세포 암종(HNSC); 신장 혈색소(KICH); 신장 신장 맑은 세포 암종(KIRC); 신장 신장 유두상 세포 암종(KIRP); 급성 골수성 백혈병(LAML); 뇌 저급 신경 교종(LGG); 간 간세포 암종(LIHC); 폐 선암종(LUAD); 폐 편평 세포 암종(LUSC); 중피종(MESO); 다발성 골수종(MM); 난소 장액성 낭상암종(OV); 췌장 선암종(PAAD); 크롬친화세포종 및 부신경절종(PCPG); 전립선 선암종(PRAD); 직장 선암종(READ); 육종(SARC); 피부 흑색종(SKCM); 위 선암종(STAD); 고환 생식 세포 종양(TGCT); 갑상선 암종(THCA); 흉선종(THYM); 자궁 체부 자궁내막암종(UCEC); 자궁 암육종(UCS); 및 포도막 흑색종(UVM).

[0068] 조성물

[0069] 본 발명의 한 양태는 Dsg2 또는 이의 에피토프에 결합하는 능력을 특징으로 하는 제제에 관한 것이다. Dsg2 또는 Dsg2 결합 분자에 결합할 수 있는 제제의 비-제한적 예는 항체, 압타머, 분자 프로브, 펩티드, 펩티드모방체, 소분자 및 이들의 접합체를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 Dsg2에 특이적으로 결합하는 항-Dsg2 나노바디를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 Dsg2 상호작용 단백질 또는 그의 단편을 포함한다. Dsg2는 동종이량체를 형성하므로, 한 구현예에서 Dsg2 결합 분자는 Dsg2 또는 또 다른 Dsg2 분자와 이량체화하는 그의 단편을 포함한다.

[0070] 일 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 다클론성 항체이다. 다른 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 단클론성 항체이다. 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 키메라 항체이다. 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 scFv 항체 단편을

포함한다.

- [0071] 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 온전한 단클론성 또는 다클론성 항체, 또는 그의 면역학적 부분 또는 활성 단편이다. 따라서, 다양한 양태에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자는 다클론성 항체, 단클론성 항체, 세포내 항체 ("인트라바디"), Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂, 단쇄 항체(scFv), 중쇄 항체(예를 들어, 예컨대 낙타과 항체), 합성 항체, 키메라 항체, 또는 인간화된 항체이다(예를 들어, 문헌[Harlow 등, 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow 등, 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston 등, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird 등, 1988, Science 242:423-426] 참고). 항체는 온전한 폴리펩티드 또는 관심 면역화 항원을 함유하는 단편을 사용하여 제조될 수 있다. 동물을 면역화하기 위해 사용되는 폴리펩티드 또는 올리고펩티드는 RNA의 번역으로부터 얻어지거나 화학적으로 합성될 수 있으며, 원한다면 담체 단백질에 접합될 수 있다. 펩티드에 화학적으로 커플링될 수 있는 적합한 담체는 소 혈청 알부민 및 티로글로불린, 열쇠구멍 샷갓조개 헤모시아닌을 포함한다. 그 다음, 커플링된 폴리펩티드는 동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 또는 토끼)을 면역화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0072] 일 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 Dsg2 항체 또는 그의 단편을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 하기 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 14의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 하기 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 18의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.
- [0073] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 8에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 16에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체, 또는 그의 단편은 서열번호: 8의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 16의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0074] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 24에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편은 서열번호: 32에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체, 또는 그의 단편은 서열번호: 24의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 32의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 변이체는 정의된 아미노산 서열과 비교할 때 명시된 영역에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 변이체는 서열번호: 8, 서열번호: 16, 서열번호: 24, 또는 서열번호: 32의 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다.
- [0076] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 단편은 정의된 아미노산 서열의 전장 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열의 단편은 서열번호: 8, 서열번호: 16, 서열번호: 24, 또는 서열번호: 32의 전장 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다.
- [0077] 본 명세서에 사용되는 용어 "항체" 또는 "면역글로불린"은 단백질의 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리의 단백질(당 단백질 포함)을 의미한다. 항체 또는 면역글로불린(Ig) 분자는 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드 및 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 사량체일 수 있다. 2개의 중쇄는 이황화물 결합에 의해 함께 연결되고 각 중쇄는

이항화물 결합에 의해 경쇄에 연결된다. 각 전장 Ig 분자는 특정 표적 또는 항원에 대해 적어도 2개의 결합 부위를 함유한다.

- [0078] 항체를 만들고 사용하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 다클론성 항체는 당업계에 잘 알려진 표준 면역학적 기술에 따라 토끼를 면역화함으로써 생성된다(예를 들어, 문헌[Harlow 등, 1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY] 참고). 이러한 기술은 말토스 결합 단백질 또는 글루타티온(GSH) 태그 폴리펩타이드 부분과 같은 또 다른 단백질의 부분 및/또는 관심 항원 단백질이 면역원성이 되도록 하는 모이어티(예를 들어, 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌(KLH)과 접합된 관심 항원)의 일부 및 각각의 항원성 단백질 아미노산 잔기를 포함하는 일부를 포함하는 키메라 단백질로 동물을 면역화하는 것을 포함한다. 키메라 단백질은 pMAL-2 또는 pCMX와 같으나 이에 제한되지 않는 이러한 목적에 적합한 플라스미드 벡터에 마커 단백질을 인코딩하는 적절한 핵산을 클로닝하여 생산된다.
- [0079] 그러나, 본 발명은 이들 항체 또는 항원의 이들 부분을 포함하는 방법 및 조성물에만 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 본 발명은 본원의 다른 곳에서 용어가 정의된 바와 같이 항원 또는 그의 부분에 대한 다른 항체를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 또한, 본 발명은 특히 관심 특정 항원에 결합하는 항체를 포괄하는 것으로 해석되어야 하며, 예를 들어 효소 결합 면역검정, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 검정, 자기 친화성 세포 분류(MACS) 검정, 및 항원 단백질의 적어도 일부를 인코딩하는 핵산으로 일시적으로 형질감염된 세포의 면역형광 현미경검사의 용액에서 웨스턴 블롯에 존재하는 항원에 결합할 수 있다.
- [0080] 당업자는 본 명세서에 제공된 개시내용에 기초하여, 항체가 항원의 임의의 부분과 특이적으로 결합할 수 있고 전장 단백질을 사용하여 그에 따라 특이적인 항체를 생성할 수 있음을 이해할 것이다. 그러나, 본 발명은 전장 단백질을 면역원으로 사용하는 것에 제한되지 않는다. 오히려, 본 발명은 특정 항원과 특이적으로 결합하는 항체를 생산하기 위해 단백질의 면역원성 부분을 사용하는 것을 포함한다. 즉, 본 발명은 항원의 면역원성 부분 또는 항원 결정인자를 사용하여 동물을 면역화하는 것을 포함한다.
- [0081] 당업자는 본 명세서에 제공된 개시내용에 기초하여 본 발명이 단일 항원 에피토프를 인식하는 단일 항체의 사용을 포함하지만 본 발명이 단일 항체의 사용에 제한되지 않는다는 것을 인식할 것이다. 대신에, 본 발명은 항체가 동일하거나 상이한 항원성 단백질 에피토프에 대해 지시될 수 있는 적어도 하나의 항체의 사용을 포함한다.
- [0082] 다클론성 항체의 생성은 원하는 동물에 항원을 접종하고 예를 들어 문헌[Harlow 등(1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)]에 기재된 것과 같은 표준 항체 생산 방법을 사용하여 그로부터 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 단리함으로써 달성된다.
- [0083] 단백질 또는 펩티드의 전장 또는 펩티드 단편에 대한 단클론성 항체는 잘 알려진 단클론성 항체 제조 절차, 예를 들어, 문헌[Harlow 등(1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY) 및 Tuszynski 등(1988, Blood, 72:109-115)]에 기재된 것들을 사용하여 제조될 수 있다. 화학 합성 기술을 사용하여 원하는 펩티드의 양을 합성할 수도 있다. 대안적으로, 원하는 펩티드를 인코딩하는 DNA는 대량의 펩티드 생성에 적합한 세포에서 적절한 프로모터 서열로부터 클로닝 및 발현될 수 있다. 펩티드에 대한 단클론성 항체는 본 명세서에 언급된 표준 절차를 사용하여 펩티드로 면역화된 마우스로부터 생성된다.
- [0084] 본 명세서에 기재된 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자는 당업계에서 이용가능하고 예를 들어 문헌[Wright 등(1992, Critical Rev. Immunol. 12:125-168)] 및 본 명세서에서 인용된 참고문헌에 기재된 기술을 사용하여 클로닝 및 시퀀싱될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 예를 들어 문헌[Wright 등], 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌, 및 문헌[Gu 등(1997, Thrombosis and Hematocyst 77:755-759)]에 기재된 기술, 및 당업계에 잘 알려져 있거나 개발될 항체를 인간화하는 다른 방법을 사용하여 "인간화"될 수 있다.
- [0085] 본 발명은 또한 Dsg2와 특이적으로 반응하는 인간화 항체의 사용을 포함한다. 본 발명의 인간화 항체는 인간 프레임워크를 갖고 관심 항원과 특이적으로 반응하는 항체, 전형적으로 마우스 항체로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 본 발명에 사용된 항체가 인간화되는 경우, 항체는 문헌[Queen, 등(미국 특허 제 6,180,370호), Wright 등,(상동) 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌, 또는 문헌[Gu 등(1997, Thrombosis and Hematocyst 77(4):755-759)]에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 문헌[Queen 등]에 개시된 방법은 부분적으로, 수용체 인간 프레임워크 영역을 인코딩하는 DNA 세그먼트에 부착된 관심 항원의 에피토프와 같은 원하는 항원에 결합할 수 있는 공여자 면역글로불린으로부터 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)을 인코딩하는 재조합 DNA 세그먼트를 발현함으로써 생산되는 인간화 면역글로불린을 디자인하는 것에 관한 것이다. 일반적으로 말하자면, 문헌[Queen 특허]의 발명은 실질적으로 임의의 인간화 면역글로불린의 설계에 적용할 수 있다. 문

현[Queen]은, DNA 세그먼트가 전형적으로 자연 연관 또는 이중 프로모터 영역을 포함하여 인간화 면역글로불린 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 DNA 서열을 포함할 것이라고 설명한다. 발현 제어 서열은 진핵 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내의 진핵 프로모터 시스템일 수 있거나, 발현 제어 서열은 원핵 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내의 원핵 프로모터 시스템일 수 있다. 벡터가 적절한 숙주에 통합되면, 숙주는 도입된 뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현에 적합한 조건 하에 유지되며, 원하는 경우 인간화 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는 온전한 항체, 결합 단편 또는 기타 면역글로불린 형태의 수집 및 정제가 뒤따를 수 있다(Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, (1979), 이는 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0086] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 항체의 기능적 등가물을 포함한다. 기능적 등가물은 항체와 유사한 결합 특성을 가지며, 예를 들어 혼성화 및 단쇄 항체뿐만 아니라 그의 단편을 포함한다. 그러한 기능적 등가물의 생산 방법은 PCT 출원 WO 93/21319 및 PCT 출원 WO 89/09622에 개시되어 있다.

[0087] 기능적 등가물은 항체의 가변 또는 초가변 영역의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. "실질적으로 동일한" 아미노산 서열은 문헌[Pearson 및 Lipman, 1988 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448]에 따른 FASTA 검색 방법에 의해 결정 시, 또 다른 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 약 80%, 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95%, 및 가장 바람직하게는 적어도 99%(또는 70 내지 99의 임의의 정수) 상동성을 갖는 서열로서 본 명세서에 정의된다. 키메라 또는 다른 하이브리드 항체는 인간 항체 불변 영역으로부터 실질적으로 또는 독점적으로 유래된 불변 영역 및 각각의 안정한 하이브리도마로부터의 단클론성 항체의 가변 영역의 서열로부터 실질적으로 또는 독점적으로 유래된 가변 영역을 갖는다.

[0088] 단쇄 항체(scFv) 또는 Fv 단편은 상호 연결 링커가 있거나 없이 경쇄의 가변 영역에 연결된 항체의 중쇄의 가변 영역으로 구성된 폴리펩티드이다. 따라서, Fv는 항체 결합 부위를 포함한다.

[0089] 본 발명의 항체의 기능적 등가물은 전체 항체의 결합 특성과 동일하거나 실질적으로 동일한 결합 특성을 갖는 항체 단편을 추가로 포함한다. 이러한 단편은 Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편 중 하나 또는 모두를 함유할 수 있다. 항체 단편은 전체 항체의 6개 보체 결정 영역 모두를 함유하지만, 3개, 4개 또는 5개의 보체 결정 영역과 같이 이러한 영역 전부보다 적은 수를 함유하는 단편도 기능적이다. 기능적 등가물은 IgG 면역글로불린 클래스 및 이의 서브클래스의 구성원이지만, 하기 면역글로불린 클래스 중 하나이거나 결합할 수 있다: IgM, IgA, IgD 또는 IgE, 및 이들의 서브클래스. IgG 서브클래스와 같은 다양한 서브클래스의 중쇄는 다른 이펙터 기능을 담당하므로, 원하는 중쇄 불변 영역을 선택하여 원하는 이펙터 기능을 가진 하이브리드 항체를 생산한다. 예시적인 불변 영역은 감마 1(IgG1), 감마 2(IgG2), 감마 3(IgG3) 및 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 유형일 수 있다.

[0090] 본 발명의 면역글로불린은 1가, 2가 또는 다가일 수 있다. 1가 면역글로불린은 이황화물 가교를 통해 하이브리드 경쇄와 연관된 하이브리드 중쇄로 형성된 이량체(HL)이다. 2가 면역글로불린은 적어도 하나의 이황화물 가교를 통해 연관된 2개의 이량체로 형성된 사량체(H₂L₂)이다.

[0091] 본 발명의 펩티드 및 키메라 단백질은 무기 산 예컨대 염산, 황산, 브롬화수소산, 인산, 등, 또는 유기 산 예컨대 포름산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 석신산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 살리실산, 벤젠설포산, 및 툴루엔설포산과 반응하여 약제학적 염으로 전환될 수 있다.

[0092] 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 Dsg2 결합 분자 또는 이의 생물학적으로 기능적인 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0093] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 인코딩한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 14의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 1의 중쇄(HC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 3의 HC CDR2 인코딩 서열, 서열번호: 5의 HC CDR3 인코딩 서열, 서열번호: 9의 경쇄(LC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 11의 LC CDR2 인코딩 서열, 및 서열번호: 13의 LC CDR3 인코딩 서열.

[0094] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또

는 6개 모두를 인코딩한다: 서열번호: 18의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 17의 중쇄(HC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 19의 HC CDR2 인코딩 서열, 서열번호: 21의 HC CDR3 인코딩 서열, 서열번호: 25의 경쇄(LC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 27의 LC CDR2 인코딩 서열, 및 서열번호: 29의 LC CDR3 인코딩 서열.

[0095] 한 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 8에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 16에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 8의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 16의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다.

[0096] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 7에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 15에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 7에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 15에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0097] 한 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 24에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다. 한 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 32에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 24의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 32의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다.

[0098] 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 23에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 31에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 항-Dsg2 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 23에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는, 서열번호: 31에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0099] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열의 변이체는 정의된 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 명시된 영역에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열의 변이체는 서열번호: 7, 서열번호: 15, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 31의 뉴클레오티드 서열의 전장에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다.

[0100] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열의 변이체는 정의된 뉴클레오티드 서열의 전장 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열의 단편은 서열번호: 7, 서열번호: 15, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 31의 전장 뉴클레오티드 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다.

- [0101] 항원성 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산 서열은 예를 들어, 표준 기술을 사용하여, 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝함으로써, 그를 함유하는 것으로 알려진 벡터로부터 유전자를 유도함으로써, 또는 그를 함유하는 세포 및 조직에서 직접 단리함으로써 당업계에 공지된 많은 재조합 방법 중 임의의 것을 사용하여 수득할 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자를 클로닝하는 대신 합성적으로 생산할 수 있다.
- [0102] 단리된 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 모든 유형의 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 조성물은 항원 단백질 또는 펩티드 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 단리된 cDNA 분자를 포함하는 단리된 DNA 분자를 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 항원성 단백질 또는 펩티드, 또는 그의 기능적 단편을 인코딩하는 단리된 RNA 분자를 포함한다.
- [0103] 본 발명의 핵산 분자는 혈청 또는 세포 배양을 위한 성장 배지에서 안정성을 개선하기 위해 변형될 수 있다. 안정성, 기능성 및/또는 특이성을 강화하고 본 발명의 핵산 분자의 면역자극 특성을 최소화하기 위해 변형이 추가될 수 있다. 예를 들어, 안정성을 강화하기 위해, 3'-잔기는 분해에 대해 안정화될 수 있으며, 예를 들어 퓨린 뉴클레오티드, 특히 아데노신 또는 구아노신 뉴클레오티드로 구성되도록 선택될 수 있다. 대안적으로, 변형된 유사체에 의한 피리미딘 뉴클레오티드의 치환, 예를 들어 2'-데옥시티미딘에 의한 우리딘의 치환은 용인되며 분자의 기능에 영향을 미치지 않는다.
- [0104] 본 발명의 한 구현예에서 핵산 분자는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드 유사체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 단부는 변형된 뉴클레오티드 유사체를 통합함으로써 안정화될 수 있다.
- [0105] 뉴클레오티드 유사체의 비-제한적 예는 당- 및/또는 백본-변형된 리보뉴클레오티드(즉, 인산염-당 백본에 대한 변형 포함)를 포함한다. 예를 들어, 천연 RNA의 포스포디에스테르 결합은 질소 또는 황 헤테로원자 중 적어도 하나를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 백본-변형 리보뉴클레오티드에서, 인접한 리보뉴클레오티드에 연결된 포스포에스테르 기는 예를 들어 포스포티오에이트 기의 변형 기로 대체된다. 일부 당-변형 리보뉴클레오티드에서, 2' OH-기는 H, OR, R, 할로, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ 또는 ON으로부터 선택되는 기로 대체되며, 여기서 R은 C₁-C₆ 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고 할로는 F, Cl, Br 또는 I이다.
- [0106] 변형의 다른 예는 자연 발생 핵염기 대신 적어도 하나의 비-자연 발생 핵염기를 함유하는 핵염기 변형 리보뉴클레오티드, 즉 리보뉴클레오티드이다. 염기는 아데노신 탈아미노효소의 활성을 차단하도록 변형될 수 있다. 변형된 핵염기의 예는 5-위치에서 변형된 우리딘 및/또는 시티딘, 예를 들어, 5-(2-아미노)프로필 우리딘, 5-브로모 우리딘; 8 위치에서 변형된 아데노신 및/또는 구아노신, 예를 들어, 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오티드, 예를 들어, 7-데아자-아데노신; O- 및 N-알킬화 뉴클레오티드를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 예를 들어, N6-메틸 아데노신이 적합하다. 위의 변형이 조합될 수 있음에 유의해야 한다.
- [0107] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 다음의 화학적 변형 중 적어도 하나를 포함한다: 하나 이상의 뉴클레오티드의 2'-H, 2'-O-메틸 또는 2'-OH 변형. 특정 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 뉴클레아제에 대한 강화된 내성을 가질 수 있다. 증가된 뉴클레아제 저항성을 위해, 핵산 분자는 예를 들어 2'-변형된 리보스 단위 및/또는 포스포티오에이트 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2' 하이드록실 기(OH)는 여러 가지 다른 "옥시" 또는 "데옥시" 치환기로 변형되거나 대체될 수 있다. 증가된 뉴클레아제 저항성을 위해, 본 발명의 핵산 분자는 2'-O-메틸, 2'-불소, 2'-O-메톡시에틸, 2'-O-아미노프로필, 2'-아미노, 및/또는 포스포티오에이트 연결을 포함할 수 있다. 잠금 핵산(LNA), 에틸렌 핵산(ENA), 예를 들어, 2'-4'-에틸렌 가교 핵산, 및 특정 핵염기 변형 예컨대 2-아미노-A, 2-티오(예를 들어, 2-티오-U), G-클램프 변형의 포함은 또한 표적에 대한 결합 친화도를 증가시킬 수 있다.
- [0108] 일 구현예에서, 핵산 분자는 2' 변형 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA)를 포함한다. 일 구현예에서, 핵산 분자는 적어도 하나의 2'-O-메틸 변형 뉴클레오티드를 포함하고, 일부 구현예에서 핵산 분자의 모든 뉴클레오티드는 2'-O-메틸 변형을 포함한다.
- [0109] 본 명세서에서 논의된 핵산 제제는 달리 비변형 RNA 및 DNA 뿐만 아니라, 예를 들어 효능을 개선하기 위해 변형된 RNA 및 DNA, 및 뉴클레오시드 대응물의 폴리머를 포함한다. 비변형 RNA는 핵산의 구성요소, 즉 당, 염기 및 인산염 모이어티가 자연에서 발생하는 것과 동일하거나 본질적으로 동일한 분자, 예를 들어 인체에서 자연적으로 발생하는 분자를 지칭한다. 당업계는 회귀하거나 혼치않지만 자연적으로 발생하는 RNA를 변형된 RNA로 언급하고 있으며, 예를 들어 문헌[Limbach 등(Nucleic Acids Res., 1994, 22:2183-2196)]를 참고한다. 종종 변형된

RNA라고 불리는 이러한 회귀하거나 혼치않은 RNA는 전형적으로 전사 후 변형의 결과이며 본 명세서에 사용되는 비변형 RNA라는 용어에 속한다. 본 명세서에 사용되는 변형된 RNA는 핵산의 성분 중 하나 이상, 즉 당, 염기 및 인산염 모이어티가 자연에서 발생하는 것과는 다르며, 예를 들어 인체에서 발생하는 것과 다른 분자를 의미한다. 그들은 "변형된 RNA"로 언급되지만 물론 변형으로 인해 엄밀히 말하면 RNA가 아닌 분자를 포함할 것이다. 뉴클레오사이드 대용물은 리보포스페이트 백본이 리보포스페이트가 아닌 작제물로 대체되어 염기가 올바른 공간 관계로 제시될 수 있도록 하는 분자로, 혼성화가 리보포스페이트 백본, 예를 들어 리보포스페이트 백본의 비전하 모방체에서 보이는 것과 실질적으로 유사하게 된다.

- [0110] 본 발명의 핵산의 변형은 포스페이트 기, 당 기, 백본, N-말단, C-말단 또는 핵염기 중 하나 이상에 존재할 수 있다.
- [0111] 본 발명은 또한 본 발명의 단리된 핵산이 삽입된 벡터를 포함한다. 당해 분야는 본 발명에 유용한 적합한 벡터로 가득 차 있다.
- [0112] 일부 구현예에서, Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 천연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로 항원 단백질 또는 펩티드 또는 그의 일부를 인코딩하는 핵산을 프로모터에 작동 가능하게 연결하고, 작제물을 발현 벡터에 혼입함으로써 달성된다. 사용되는 벡터는 복제 및 경우에 따라 진행 세포 내 통합에 적합하다. 전형적인 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현 조절에 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열 및 프로모터를 함유한다.
- [0113] 본 발명의 벡터는 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 사용하여 핵산 번역화 및 유전자 요법에 사용될 수 있다. 유전자 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,399,346호, 제5,580,859호, 및 제5,589,466호를 참고하고, 이는 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.
- [0114] 본 발명의 단리된 핵산은 많은 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파아지미드, 파아지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 관심 벡터에는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터가 포함된다.
- [0115] 또한, 벡터는 바이러스 벡터 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook 등(2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)], 그리고 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유한다(예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193를 참조한다).
- [0116] 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 벡터에 삽입되고 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 이어서 재조합 바이러스는 단리되어 생체내 또는 생체의 대상체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 일 구현예에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0117] 예를 들어, 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터는 이식유전자의 장기적이고 안정적인 통합과 딸 세포에서의 증식을 허용하는 장기 유전자 전달을 달성하는 데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 간 세포와 같은 비-증식 세포를 형질도입할 수 있다는 점에서 무린 백혈병 바이러스와 같은 온코-레트로바이러스로부터 유래한 벡터에 비해 추가적인 이점이 있다. 또한 낮은 면역원성이라는 추가적인 이점을 가지고 있다. 일 구현예에서, 조성물은 아데노 연관 바이러스(AAV)로부터 유래된 벡터를 포함한다. 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터는 다양한 장애 치료를 위한 강력한 유전자 전달 도구가 되었다. AAV 벡터는 병원성 결여, 최소 면역원성 및 안정적이고 효율적인 방식으로 유사분열 후 세포를 형질도입하는 능력을 포함하여 유전자 요법에 이상적으로 적합하게 만드는 많은 특징을 가지고 있다. AAV 벡터에 함유된 특정 유전자의 발현은 AAV 혈청형, 프로모터 및 전달 방법의 적절한 조합을 선택하여 하나 이상의 세포 유형을 특이적으로 표적화할 수 있다.
- [0118] 특정 구현예에서, 벡터는 또한 플라스미드 벡터로 형질감염되거나 본 발명에 의해 생산된 바이러스로 감염된 세포에서 그의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 이식유전자에 작동 가능하게 연결된 통상적인 제어 요소를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접하는 발

현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어 하기 위해 트랜스로 또는 일정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 모두를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 처리 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 강화시키는 서열 (즉, 코작(Kozak) 공통 서열); 단백질 안정성을 강화시키는 서열; 및 원할 때, 인코딩된 생성물의 분비를 강화시키는 서열을 포함한다. 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직 특이적 프로모터를 포함하는 다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있고 이용될 수 있다.

[0119] 추가 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시 빈도를 조절한다. 전형적으로 이들은 시작 부위의 30-110 bp 업스트림 영역에 위치하지만 최근에는 많은 프로모터가 시작 부위의 다운스트림에도 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 유연하므로 요소가 역전되거나 서로 상대적으로 이동할 때 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 간격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소가 협력적으로 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화할 수 있는 것으로 보인다.

[0120] 적합한 프로모터의 한 예는 전초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이 프로모터 서열은 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1α(EF-1α)이다. 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열이 또한 사용될 수 있고 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡슈타인-바르 바이러스 즉시 초기 프로모터, 루 육종 바이러스 프로모터, 뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터 예컨대, 비제한적인 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나제 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안 된다. 유도성 프로모터가 또한 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 그러한 발현이 바람직할 때 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켜거나 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0121] 벡터에서 발견되는 인핸서 서열은 또한 그 안에 함유된 유전자의 발현을 조절한다. 전형적으로 인핸서는 단백질 인자와 결합하여 유전자의 전사를 강화시킨다. 인핸서는 조절하는 유전자의 업스트림 또는 다운스트림에 위치할 수 있다. 인핸서는 또한 특정 세포 또는 조직 유형에서 전사를 강화하기 위해 조직 특이적일 수 있다. 일 구현 예에서, 본 발명의 벡터는 벡터 내에 존재하는 유전자의 전사를 촉진하기 위한 하나 이상의 인핸서를 포함한다.

[0122] Dsg2 결합 분자의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질 감염되거나 감염되도록 하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 식별 및 선별을 용이하게 할 수 있다. 다른 양태에서, 선별가능한 마커는 별도의 DNA 조각 상에 운반될 수 있고 공동-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자 모두는 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 축적될 수 있다. 유용한 선택 가능한 마커는 예를 들어 네오(neo) 등과 같은 항생제 내성 유전자를 포함한다.

[0123] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고 조절 서열의 기능을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수형체 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않고 발현이 효소 활성과 같은 일부 쉽게 검출 가능한 특성에 의해 나타나는 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용 세포에 도입된 후 적절한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제, 클로르암페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비된 알칼리성 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Ui-Tei 등, 2000 FEBS Letters 479: 79-82]). 적합한 발현 시스템은 알려져 있고 잘 알려진 기술을 사용하여 제조하거나 상업적으로 얻을 수 있다. 일반적으로 리포터 유전자의 발현 수준이 가장 높은 최소 5' 축적 영역을 갖는 작제물이 프로모터로 확인된다. 이러한 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고 프로모터 유도 전사를 조절하는 능력에 대한 제제를 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0124] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 발현 벡터의 문맥에서, 벡터는 당업계의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0125] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입,

전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 문헌[Sambrook 등(2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 참고한다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포로 도입하는 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0126] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포에 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노 바이러스 및 아데노 연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참고한다.

[0127] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산물 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로구형체, 비드 및 수중유 에멀전, 교질입자, 혼합된 교질입자를 포함하는 지질 기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체 내 전달 비히클로 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0128] 비-바이러스 전달 시스템이 이용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 핵산을 숙주 세포로 도입하기 위해 고려된다(시험관 내, 생체 외 또는 생체 내). 또 다른 양태에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 연관된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되고, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되어 있으며, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 둘 다와 연관된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되고, 리포솜에 포획되고, 리포솜과 복합체를 이루고, 지질을 함유하는 용액에 분산되고, 지질과 혼합되고, 지질과 조합되고, 지질에 현탁액으로 함유되어 있으며, 마이셀을 함유하거나 복합화되거나, 달리 지질과 연관될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 회합 조성물은 용액 중의 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이중층 구조, 마이셀 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 그들은 또한 단순히 용액에 산재되어 크기나 모양이 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예컨대 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 및 알데하이드를 함유하는 화합물의 부류뿐만 아니라 세포질에서 자연 발생 지방 액적을 함유한다.

[0129] 사용하기에 적합한 지질은 상업적 공급원에서 얻을 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 Sigma(St. Louis, MO)로부터 입수할 수 있으며; 디세틸 포스페이트("DCP")는 K & K Laboratories(Plainview, NY)로부터 입수할 수 있고; 콜레스테롤("Chol")은 Calbiochem-Behring에서 얻을 수 있으며; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올의 지질의 스톱 용액은 약 -20°C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발하기 때문에 유일한 용매로 사용된다. "리포솜"은 둘러싸인 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중라멜라 지질 비히클을 포괄하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다중라멜라 리포솜은 수성 매질로 단리된 여러 지질 층을 가지고 있다. 인지질이 과량의 수용액에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 닫힌 구조가 형성되기 전에 자가 재배열을 거치고 지질 이중층 사이에 물과 용해된 용질을 포획한다(Ghosh 등, 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나 용액에서 정상적인 소포 구조와 다른 구조를 갖는 조성물도 포괄된다. 예를 들어, 지질은 마이셀 구조를 추정하거나 단순히 지질 분자의 불균일한 집합체로 존재할 수 있다. 리포펙타민-핵산 복합체도 고려된다.

[0130] 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하는 데 사용된 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정은 예를 들어 서던 및 노던 블롯팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업자에게 잘 알려진 "분자 생물학적" 검정; "생화학적" 검정, 예를 들어 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위에 속하는 제제를 확인하기 위해 본 명세서에 기재된 검정에 의한 특정 펩티드의 존재 또는 부재 검출을 포함한다.

[0131] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2 결합 분자, 또는 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 전달 비히클을 제공한다. 예시적인 전달 비히클은 마이크로스피어, 마이크로입자, 나노입자, 폴리머솜, 리포솜, 및 마이셀을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 전달 비히클은 Dsg2 결합 분자, 또는 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자로 로딩된다. 특정 구현예에서, 전달 비히클은 로딩된 전달대상물의 제어 방출, 지연 방출, 또는 연속 방출을 제공한다. 특정 구현예에서, 전달 비히클은 전달 비히클을 치료 부위로 표적화하는 표적화 모이어티를 포함한다.

[0132] 면역치료 조성물

[0133] 일부 구현예에서, 본 발명은 면역요법, 구체적으로 원하는 조건 하에서 이식유전자를 발현하도록 유전자 조작된 면역 세포를 기반으로 하는 표적화 세포 요법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 이식유전자는 Dsg2 결합 분자 또는 그의 단편을 인코딩한다. 이식유전자가 내인성 프로모터의 제어 하에 놓이도록 면역 세포의 게놈으로의 치료 이식유전자의 통합을 표적화함으로써 면역요법을 위한 면역 세포를 생성하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 문맥상 달리 나타내지 않는 한 본 명세서에 기재된 이식유전자(단수형)에 대한 언급은 하나 이상의 이식유전자들(복수형)에도 적용됨을 이해할 것이다. 본 발명은 치료 면역 세포에서 제어된 시공간적 발현을 제공하기 위해 하나 이상의 내인성 프로모터의 제어 하에 하나 이상의 치료 이식유전자를 배치하기 위해 게놈 편집을 이용하는 면역 세포 요법을 위한 전략을 제공한다. 본 발명은 치료 이식유전자 또는 다양한 치료 이식유전자를 발현하도록 조작되는 면역 세포를 제공하며, 이식유전자의 발현은 발현을 제공하는 내인성 프로모터의 사용에 의해 면역 세포의 위치(예를 들어, 종양에 근접한 곳에서만 이식유전자의 발현) 또는 정의된 시점(예를 들어, 종양 세포에 관여하기 전 또는 후에)에 따라 이루어질 수 있다. 따라서 본 발명의 세포 및 방법은 치료 면역 세포의 효능 및 안전성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0134] 일 구현예에서, 본 발명의 면역 세포는 T 세포, B 세포, NK 세포, 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포 또는 대식세포), 단핵구, 호중구, 호산구, 또는 호염기구이다.

[0135] 일부 구현예에서, 본 발명은 면역 세포에서 원하는 이식유전자 발현 프로파일을 달성하기 위해 내인성 프로모터의 제어 하에 치료 이식유전자를 배치하는 것에 관한 것이다. 내인성 프로모터는 이식유전자의 발현 특성, 예를 들어 이식유전자 발현 시기 및/또는 이식유전자 발현 수준을 조절하도록 선택된다. 내인성 프로모터의 제어 하에 이식유전자를 배치하여 이식유전자의 발현을 조절하면 이식유전자, 면역원성 성분 및 내부 프로모터 및 이식유전자를 인코딩하는 바이러스 벡터의 발현을 유도하기 위해 소분자 약물을 투여할 필요가 없다. 내인성 프로모터를 이용함으로써, 면역 세포는 이식 유전자의 발현을 자율적으로 조절하도록 조작되고, 이로써 예를 들어 이식유전자 발현이 활성화되는 경우 및 때에, 이식유전자 발현은 바람직하게는 환경 단서(예를 들어 표적 항원, 사이토카인 및/또는 동시자극 리간드에 대한 근접성)에 대한 면역 세포의 조정된 내인성 반응에 의존하는 정의된 프로그램에서 발생한다. 따라서, 특정 구현예에서, 면역 세포는 미세-환경 단서에 반응하는 내인성 프로모터가 사용되어 내인성 프로모터에 의해 지배되는 공간적 및 시간적으로 예측 가능한 이식유전자 발현을 초래하도록 조작된다.

[0136] 특정 구현예에서, 치료 이식유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 또 다른 특정 구현예에서, 치료 이식유전자는 치료 RNA를 인코딩한다.

[0137] 면역 세포

[0138] 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 포함하는 면역 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 제공한다. 일 구현예에서, 재조합 세포는 Dsg2 발현 세포에 대한 면역 반응을 강화시키거나 제공하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 인간으로부터 유래되고(재조합되기 전에 인간 기원이고)(그리고 인간 유래 세포는 본 발명의 치료 방법에서 인간에게 투여하기에 특히 바람직하다).

[0139] 일부 구현예에서, 본 발명의 면역 세포로서 유용한 T 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있고 T 헬퍼 세포(CD4+), 세포독성 T 세포(세포독성 T 림프구, CTL; CD8+ T 세포라고도 함), 및 중심 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 줄기세포 유사 기억 T 세포(또는 줄기 유사 기억 T 세포), 및 이펙터 기억 T 세포, 예를 들어, T_{EM} 세포 및 T_{EMRA}(CD45RA+) 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, T 조절 세포, 자연 살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포(MAIT), 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 기억 T 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 주요 T-세포 하위유형에는 T_N(나이프), T_{SCM}(줄기 세포 기억), T_{CM}(중심 기억), T_{TM}(과도기적 기억), T_{EM}(이펙터 기억), 및 T_{TEB}(말단 이펙터), TCR-형질전환 T-세포, 보편적인 사이토카인 매개 사멸(TRUCK)을 재지정된 T-세포, 종양 침윤 T-세포(TIL), CAR-T-세포 또는 질환이나 장애를 치료하는 데 사용할 수 있는 임의의 T-세포를 포함한다.

[0140] 일 구현예에서, 본 발명의 T 세포는 면역자극 세포, 즉 면역 반응을 매개하는 세포이다. 면역자극성인 예시적인 T 세포는 T 헬퍼 세포(CD4+), 세포독성 T 세포(세포독성 T 림프구, CTL; CD8+ T 세포라고도 함), 및 중심 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 줄기세포 유사 기억 T 세포(또는 줄기 유사 기억 T 세포), 및 이펙터 기

역 T 세포, 예를 들어, TEM 세포 및 TEMRA(CD45RA+) 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, 자연 살해 T 세포, 점막 관련 불변 T 세포(MAIT), 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 기억 T 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0141] 면역 세포는 선택적으로 배아 줄기 세포 또는 유도 다분화능 줄기 세포(iPSC)로부터 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어 CAR)를 재조합적으로 발현하는 사용될 수 있는 면역 세포의 전구 세포는 예를 들어 조혈 줄기 및/또는 선조 세포이다. 조혈 줄기 및/또는 선구 세포는 당업계에 공지된 방법에 의해 골수, 제대혈, 사이토카인 동원 후의 성인 말초 혈액 등으로부터 유래될 수 있고, 이어서 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어 CAR)를 재조합적으로 발현하도록 유전적으로 조작된다. 일부 구현예에서, 전구 세포는 림프양 계통으로 분화할 수 있는 세포, 예를 들어 원하는 면역 세포 유형으로 분화할 수 있는 림프양 계통의 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포이다. 일 구현예에서, iPSC는 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어 CAR)의 발현을 위한 세포로서 이용될 수 있다.

[0142] 면역 세포는 상업적으로 입수가능한 단리 방법을 포함하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 단리할 수 있다. 면역 세포의 공급원에는 말초 혈액, 제대혈, 골수 또는 다른 조혈 세포의 공급원이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. T 세포와 같은 원하는 면역 세포를 단리하거나 풍부하게 하기 위해 세포를 분리하기 위해 다양한 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어 음성 선택 방법을 사용하여 원하는 면역 세포가 아닌 세포를 제거할 수 있다. 추가로, 원하는 T 세포를 단리하거나 풍부하게 하기 위해 양성 선택 방법을 사용할 수 있거나, 양성 선택 방법과 음성 선택 방법을 조합하여 사용할 수 있다. 단클론성 항체(mAb)는 특정 세포 계통 및/또는 양성 및 음성 선택 모두에 대한 분화 단계와 관련된 마커를 식별하는 데 특히 유용하다. 특정 유형의 T 세포를 단리해야 하는 경우, CD3, CD4, CD8, CD34(조혈 줄기 및 선조 세포용) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 세포 표면 마커 또는 마커 조합을 사용하여 당업계에 잘 알려진 바와 같이 세포를 분리한다.

[0143] 세포 분리 절차는 밀도 구배 원심분리, 세포 밀도를 수정하는 입자에 대한 커플링, 항체 코팅된 자성 비드를 사용한 자성 분리, 친화성 크로마토그래피; 단클론성 항체(mAb)에 연결되거나 이와 함께 사용되는 세포독성제(보체 및 세포독소를 포함하지만 이에 제한되지 않음) 및 예를 들어 플레이트 또는 칩과 같은 고체 매트릭스에 부착된 항체로 패닝(panning), 용리, 유도 세포측정, 또는 임의의 다른 편리한 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0144] 면역 세포는 본 발명의 치료 방법에서 투여되는 대상체에 대해 자가 또는 비-자가일 수 있다. 자가 세포는 조작된 면역 세포가 투여될 대상체로부터 단리된다. 일 구현예에서, 자가 세포는 CAR을 재조합적으로 발현하는 조작된 세포가 투여될 대상체로부터 단리된다. 선택적으로, 백혈구 성분채집술에 의해 세포를 얻을 수 있는데, 여기서 백혈구는 채취된 혈액으로부터 선택적으로 제거되고, 재조합된 후 공여자에게 재수혈된다. 대안적으로, 대상체가 아닌 비-자가 공여자의 동종이계 세포를 사용할 수 있다. 비-자가 공여자의 경우, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 적절한 수준의 호환성을 결정하기 위해 세포를 유형화하고 인간 백혈구 항원(HLA)에 대해 일치시킨다. 자가 및 비-자가 세포 둘 다에 대해, 세포는 선택적으로 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 대상체에게 유전자 조작 및/또는 투여를 위해 사용될 준비가 될 때까지 동결보존될 수 있다.

[0145] CAR의 재조합 발현에 사용될 수 있는 면역 세포를 단리하기 위한 다양한 방법은 이전에 기재되었으며, 말초 공여자 림프구를 사용하는 것(Sadelain 등, Nat. Rev. Cancer 3:35-45(2003); Morgan 등, Science 314:126-129(2006), 중앙 생검에서 중앙 침윤 림프구(TIL)로부터 유래된 림프구 배양물을 사용하는 것(Panelli 등, J Immunol. 164:495-504(2000); Panelli 등, J Immunol. 164:4382-4392(2000)), 및 인공 항원 제시 세포(AAPC) 또는 수지상 세포를 이용하는 선택적으로 시험관 내에서 확장된 항원 특이적 말초 혈액 백혈구 사용하는 것(Dupont 등, Cancer Res. 65:5417-5427(2005); Papanicolaou 등, Blood 102:2498-2505(2003))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 줄기 세포를 사용하는 경우, 당업계에 잘 알려진 방법으로 세포를 단리할 수 있다(예를 들어, 문헌[Klug 등, Hematopoietic Stem Cell Protocols, Humana Press, New Jersey(2002); Freshney 등, Culture of Human Stem Cells, John Wiley & Sons(2007)] 참고).

[0146] 일 구현예에서, 단리된 면역 세포는 본 발명의 Dsg2 결합 분자의 재조합 발현을 위해 생체외에서 유전적으로 조작된다. 일 구현예에서, 단리된 면역 세포는 CAR의 재조합 발현을 위해 생체외에서 유전적으로 조작된다. 세포는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 재조합 발현을 위해 유전적으로 조작될 수 있다.

[0147] 면역 세포는 세포의 유지 또는 확장을 촉진하는 조건에 놓일 수 있다. 세포는 체외 유전 공학 이전 또는 이후에 확장될 수 있다. 세포의 확장은 대상체에게 투여하기 위한 세포의 수를 증가시키는데 특히 유용하다. T 세포와 같은 면역 세포의 확장을 위한 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 또한, 세포는 단리 및/또는 유전 공학

및/또는 유전적으로 조작된 세포의 확장 후에 동결 보존될 수 있다. 세포를 동결 보존하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0148] 재조합 세포

[0149] 일부 구현예에서 본 발명은 내인성 프로모터의 제어 하에 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 재조합적으로 발현하는 면역 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어, CAR)를 인코딩하는 핵산이 면역 세포에 도입된다. 전통적으로, 이러한 방법은 적합한 발현 벡터를 이용했으며, 이 경우 면역 세포는 이식유전자, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 핵산으로 형질도입된다. 일 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어, CAR)는 게놈 내의 부위에서 이식유전자의 표적화된 통합을 제공하는 표적화 작제물로 클로닝된다. 예를 들어, 본 발명의 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 표적화 작제물 또는 적합한 벡터 예컨대 레트로바이러스 벡터에 클로닝될 수 있고 잘 알려진 분자 생물학 기술을 사용하여 면역 세포에 도입될 수 있다.

[0150] 본 발명의 면역 세포(예를 들어, 인간 T 세포)에서의 발현에 적합한 임의의 적합한 표적화 작제물이 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 표적화 작제물은 세포의 게놈 내의 부위에서 핵산 서열(이식유전자)의 표적화된 통합에 적합한 상동성 재조합 시스템과 함께 사용하기에 적합하다. 예시적인 상동 재조합 시스템은 당업계에 잘 알려져 있으며 뉴클레아제를 이용하는 기술, 예를 들어 전사 활성제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 클러스터링 규칙적으로 공간사이의 짧은 회문 반복(CRISPR) 시스템 예컨대 및 CRISPR 연관된 단백질 9(Cas9) 및 Cpf1, 및/또는 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal(Tal 도메인 및 메가뉴클레아제의 융합) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않고, 이는 상동 재조합을 제공한다. 그러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 상업적으로 이용가능하다. 다른 CRISPR 기반 시스템에는 발열원 및 아우레우스(Aureus)가 포함된다. 이러한 방법은 상동성 재조합을 수행하거나 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

[0151] 벡터 및 표적화 작제물

[0152] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노 연관 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스, 소 유두종 바이러스 유래된 벡터, 및 헤르페스 바이러스 벡터, 예컨대 엡슈타인-바르 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(예를 들어 문헌[Miller, Hum. Gene Ther. 1(1):5-14(1990); Friedman, Science 244:1275-1281(1989); Eglitis 등, BioTechniques 6:608-614(1988); Tolstoshev 등, Current Opin. Biotechnol. 1:55-61(1990); Sharp, Lancet 337:1277-1278(1991); Cornetta 등, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 36:311-322(1989); Anderson, Science 226:401-409(1984); Moen, Blood Cells 17:407-416(1991); Miller 등, Biotechnology 7:980-990(1989); Le Gal La Salle 등, Science 259:988-990(1993); 및 Johnson, Chest 107:77S-83S(1995); Rosenberg 등, N. Engl. J. Med. 323:370(1990); Anderson 등, 미국 특허 제5,399,346호; Scholler 등, Sci. Transl. Med. 4:132-153(2012); Parente-Pereira 등, J. Biol. Methods 1(2):e7(1-9)(2014); Lamers 등, Blood 117(1):72-82(2011); Reviere 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737(1995); Wang 등, Gene Therapy 15:1454-1459(2008)] 참고)

[0153] 일부 구현예에서, 벡터는 재조합체 아데노 연관 바이러스(rAAV), 재조합체 비-통합 렌티바이러스(rNILV), 재조합체 비-통합 감마-레트로바이러스(rNIgRV), 단일-가닥 DNA(선형 또는 원형), 등이다.

[0154] 세포 게놈의 한 부위 내에 통합된 이식유전자의 발현을 제어 하기 위해 내인성 프로모터를 이용하는 본 발명의 방법에서, 표적화 작제물은 바람직하게는 프로모터가 없다.

[0155] 일부 구현예에서, 면역 세포에서 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어, CAR)의 발현을 위해 적합한 프로모터를 이용하는 벡터가 활용될 수 있다. 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성적 프로모터일 수 있다.

[0156] 일부 구현예에서, 본 발명의 작제물은 이식유전자를 인코딩하는 핵산 서열의 바로 업스트림에 P2A 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 표적화 작제물은 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 직접 상류에 P2A 서열을 포함하도록 선택적으로 설계될 수 있다. P2A는 단백질 서열의 바이스트론 또는 멀티시스트론 발현에 사용될 수 있는 자가 절단 펩티드 서열이다(Szymczak 등, Expert Opin. Biol. Therapy 5(5):627-638(2005)). 원하는 경우, 작제물은 리포터, 예를 들어 형질도입된 세포의 식별을 제공하는 리포터 단백질을 포함하도록 선택적으로 설계될 수 있다. 예시적인 리포터 단백질은 형광 단백질, 예컨대 mCherry, 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질, 예를 들어, EBFP, EBFP2, 아zur이트(Azurite), 및 mKalamal, 청록색 형광 단백질, 예를 들어, ECFP, 세룰리안, 및 CyPet, 및 황색 형광 단백질, 예를 들어, YFP, 시트린, Venus, 및 YPet를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0157] 일부 구현예에서, 작제물은 이식유전자의 폴리아데닐화(폴리 A) 서열 3'을 포함한다. 예를 들어, 일

구현예에서, 작제물은 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 폴리아데닐화(poly A) 서열 3'을 포함한다.

[0158] 통상적인 분자 생물학 기술을 사용하여, 바람직하게는 CAR을 인코딩하는 이식유전자의 형질도입 효율을 결정하기 위해 검정이 사용될 수 있다. 유전자 전달 효율은 형질도입된 면역 세포의 분획을 정량화하기 위한 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석 및/또는 정량적 PCR에 의해 모니터링될 수 있다. 잘 확립된 공동 배양 시스템을 사용하여(Gade 등, Cancer Res. 65:9080-9088(2005); Gong 등, Neoplasia 1:123-127(1999); Latouche 등, Nat. Biotechnol. 18:405- 409(2000)), 암 항원을 발현하는 섬유아세포 AAPC(대 대조군)가 CAR(IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF에 대한 세포 상청액 LUMINEX(Austin Tex.) 검정)을 발현하는 형질도입된 면역 세포로부터 사이토카인 방출, 면역 세포 증식(카복시플루오레세인 석신이미달 에스테르(CFSE) 라벨링에 의해), 및 면역 세포 생존(아넥신 V 염색에 의해)을 지시하는지 여부를 결정할 수 있다. CAR을 발현하는 면역 세포는 표적 항원 양성 세포에 의해 반복된 자극에 노출될 수 있으며, 면역 세포 증식 및 사이토카인 반응이 반복된 자극에 의해 유사하게 유지되는지 또는 감소되는지를 결정할 수 있다. 일 구현예에서, CAR을 발현하는 면역 세포는 암 항원 양성 표적 세포에 의해 반복된 자극에 노출될 수 있으며, 면역 세포 증식 및 사이토카인 반응이 반복된 자극에 의해 유사하게 유지되는지 또는 감소되는지를 결정할 수 있다. 여러 E:T 비율의 세포독성 검정은 크롬 방출 검정을 사용하여 수행할 수 있다.

[0159] 일부 구현예에서, 본 발명은 이식유전자가 면역 세포의 내인성 프로모터의 제어 하에 놓이도록 면역 세포의 게놈 내의 한 부위에 이식유전자를 통합함으로써 면역 세포에서 치료 이식유전자를 발현시키는 것에 관한 것이다. 내인성 프로모터를 이용함으로써, 면역 세포는 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 치료 이식유전자 또는 다양한 치료 이식유전자를 발현하도록 조작된다. 특정 구현예에서, 이식유전자의 발현은 면역 세포의 미세환경에 의존한다. 예를 들어, 치료 이식유전자의 발현(예를 들어, 종양에 근접한 곳에서만 이식유전자의 발현)은 면역 세포가 특정 위치에 있을 때(예를 들어, 면역 세포가 종양의 위치에 있고 종양 항원에 결합하여 활성화되어 내인성 프로모터를 유도하는 경우) 유도되는 내인성 프로모터를 사용하여 면역 세포의 위치에 따라 만들어질 수 있거나, (예를 들어, 규정된 시점에서 유도되는 내인성 프로모터를 사용함으로써, 예를 들어 종양 세포를 만날 때 면역 세포의 활성화에 의해) 규정된 시점에 존재할 수 있다. 예를 들어, 면역 세포가 항원과 만난 후 프로모터가 얼마나 빨리 활성화 또는 억제되는지, 얼마나 강하게 발현되는지, 얼마나 오래 동안 프로모터가 선택되는지에 따라 프로모터가 선택된다. 프로모터는 발현을 조절하는 이식유전자에 대한 약리학을 수용하도록 선택된다(예를 들어, 일부 이식유전자는 낮은 수준에서 더 효과적이며, 다른 이식유전자는 높은 수준의 발현에서 더 효과적임 등). 면역 세포에서 이식유전자의 발현을 제어하는 내인성 프로모터(단수)의 사용에 관한 본 개시내용의 설명은 문맥에서 달리 나타내지 않는 한 면역 세포에서 각각 이식유전자(다른 이식유전자와 동일하거나 상이할 수 있음)의 발현을 제어하는 하나 초과 내인성 프로모터의 사용에 동일하게 적용됨을 이해할 것이다. 당업자는 면역 세포 요법에 사용하기 위한 면역 세포의 유효성을 강화하기 위해 하나 이상의 이식유전자의 원하는 발현 및/또는 조절을 제공하기 위해 적절한 내인성 프로모터를 쉽게 선택할 수 있다.

[0160] 내인성 면역 세포 프로모터는 구성적이거나 유도성일 수 있다. 특정 구현예에서, 내인성 프로모터는 면역 세포의 서브세트에 대해 특이적이다. 하나 이상의 이식유전자가 면역 세포에서 발현되는 경우, 이식유전자(서로 상이할 수 있음)는 각각 구성적 및 유도성 프로모터의 조합의 제어 하에 놓일 수 있으며, 그 중 하나 이상은 예를 들어, 면역 세포의 서브세트에 대해 특이적일 수 있다.

[0161] 일 구현예에서, 내인성 면역 세포 프로모터는 구성적이다. 다른 구현예에서, 내인성 면역 세포 프로모터는 유도성이다. 특정 구현예에서, 내인성 면역 세포 프로모터는 면역 세포의 서브세트에서 활성화이다. 일 구현예에서, 2개 이상의 이식유전자가 면역 세포의 게놈으로 통합되어, 각각의 이식유전자의 발현이 면역 세포의 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 특정 구현예에서, 따라서 2개의 이식유전자가 통합된다. 특정 구현예에서, 2개의 이식유전자 각각의 발현은 구성적인 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 2개의 이식유전자 각각의 발현은 유도성인 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 제1 이식유전자의 발현은 구성적 내인성 프로모터의 제어 하에 있고, 제2 이식유전자의 발현은 유도성 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 3개의 이식유전자가 면역 세포의 게놈에 통합되어 각각의 이식유전자의 발현이 면역 세포의 다른 내인성 프로모터의 제어 하에 있고, 제1 이식유전자의 발현은 구성적 내인성 프로모터의 제어 하에 있고 제2 및 제3 이식유전자의 발현은 각각 2개의 상이한 유도성 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 면역 세포에서 발현될 이식유전자에 따라 적절한 발현 수준, 발현 시간, 면역 세포가 특정 미세환경에 있을 때의 발현 등을 제공하기 위해 프로모터가 선택될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 이식유전자 1의 발현은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있으며, 이식유전자 2의 발현은 면역 세포에 의해 인식되는 항원과 접촉한 직후 활성화되는 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있고, 이식유전자 3의 발현은 이

식유전자 2와는 다른 수준에서 또는 나중에 활성화되는 다른 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 이 특정 예에서, 이식유전자 1은 구성적으로 발현되고, 이식유전자 2 및 3은 뚜렷한 특징을 가진 유도성 프로모터의 제어 하에 있다.

[0162] 내인성 면역 세포 프로모터로부터 이식유전자를 발현하기 위한 본 발명의 면역 세포의 조작은 면역 세포에 의한 이식유전자 발현의 자율적 조절을 제공한다. 따라서, 면역 세포의 미세환경은 특히 적어도 하나의 유전자가 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 때 형질전환 면역 세포의 최적화된 활성을 제공하기 위해 다중 이식유전자의 발현을 조정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포 요법은 면역 세포 자극 사이토카인의 투여를 동반할 수 있다(문헌[Sadelain 등, Cancer Disc. 3:388-398(2013) 참조] 일 구현예에서, 본 발명의 면역 세포는 CAR 및 제2 이식유전자, 예컨대 면역 세포 활성화 사이토카인을 공동 발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, CAR은 구성적 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있고, 제2 이식유전자 예컨대 면역 세포 활성화 사이토카인(예를 들어, 인터류킨 12(IL12))는, 제2 이식유전자를 제어하는 유도성 프로모터의 활성화가 예를 들어, 면역 세포가 종양과 같이 CAR에 의해 인식되는 항원에 근접할 때, 예를 들어 면역 세포가 CAR에 결합하여 표적 종양 항원과 결합할 때 발생하도록 유도성 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있다. 이 예에서, 그러한 작제물은 독성을 초래할 수 있는 면역 세포 활성화 사이토카인의 전신 또는 국소 투여에 대한 필요성을 제거한다. 또한, 면역 세포가 약물 투여에 의해 조절될 수 있는 유도성 프로모터의 제어 하에 면역 세포 활성화 사이토카인을 발현하도록 조작되는 경우, 이러한 작제물은 약물 투여의 필요성을 제거한다. 그러한 경우에, 이식유전자의 발현을 유도하기 위해 약물을 투여할 필요가 있는 대신에, 이식유전자 발현의 조절은 이식유전자의 발현을 제공하는 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 대신, 면역 세포 자체는, 표적 항원에 관여하면 면역 세포 활성화 사이토카인의 발현을 활성화하여 사이토카인의 국소적 발현, 및 따라서 면역 요법에 사용되는 면역 세포의 유효성을 최적화하기 위한 이식유전자 발현의 시공간적 조절을 제공한다.

[0163] 또 다른 예에서, CAR을 발현하는 면역 세포는 때때로 독성을 나타낼 수 있다. 이러한 독성을 감소시키기 위해, 특정 구현예에서, 따라서 CAR을 인코딩하는 이식유전자는 면역 세포가 CAR에 의해 인식되는 표적, 예를 들어 표적 종양과 관여할 때까지 프로모터가 유도되지 않고 CAR의 발현이 발생하지 않도록 유도성 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 면역 세포는 특정 표적에 대해 더 높은 선택성을 갖도록 조작될 수 있다. 예를 들어 일부 경우에는 종양의 표적 항원이 종양에서만 발현되지 않을 수 있다. 따라서 표적 항원에 대한 면역 세포의 표적화는 동일한 항원을 발현하는 비-표적 세포 또는 조직에 대한 면역 반응을 초래할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 면역 세포는 표적 종양에 대해 더 높은 선택성을 제공하는 표적 종양 상의 2개의 항원을 인식하도록 조작된다. 예를 들어, 면역 세포는 2개의 상이한 종양 항원에 특이적인 2개의 CAR을 발현하도록 조작될 수 있다. 이 경우, 2개의 표적 항원을 보유하는 표적에 대한 면역 세포의 선택적 결합은 유도성 내인성 프로모터, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 면역 세포 활성화 사이토카인의 제어 하에 제3의 이식유전자와 커플링될 수 있고, 이로써 표적과의 선택적 관여 시에만 사이토카인으로 면역 세포의 활성화를 자극한다. 당업자는 구성적이고, 면역 세포의 아형에 특이적이고, 유도성이거나, 또는 이들의 조합인 적합한 내인성 면역 세포 프로모터의 제어 하에 발현될 적합한 치료적 이식유전자의 선택이 보다 효과적인 면역 세포 요법을 제공하기 위해 이식유전자의 자율적으로 조절된 발현을 생성하는 데 사용될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 일 구현예에서, 1개의 항원을 표적화하는 완전히 적격한 CAR을 사용하는 대신에, 2개의 상이한 항원을 표적화하는 2개의 준최적 CAR은 완전한 항종양 반응에 관여할 필요가 있다. 건강한 조직이 하나 또는 다른 항원을 발현하는 경우, 건강한 조직은 CAR 면역 세포 반응에 완전히 관여하지 않는다. 종양이 두 항원을 발현하면 완전한 CAR 면역 세포 활동을 유발할 것이다.

[0164] 일부 구현예에서, 본 발명의 형질전환 면역 세포는 구성적 및 유도성 프로모터 모두를 포함하며, 이는 면역 세포가 선택된 위치 및 시간에 새로운 치료 분자를 생성하기 위해 특정 분자 신호에 특이적으로 반응하도록 조작될 수 있기 때문이다. 예를 들어, 항원 특이적 세포-표면 수용체(예를 들어, 본 발명의 Dsg2 결합 분자)를 인코딩하는 이식유전자는 구성적 프로모터로부터 발현될 수 있고 그 특정 항원과의 상호작용시에만 신호를 보낼 것이다. 그 다음 이 상호 작용은 치료 분자의 발현을 제어하는 특정 프로모터의 활성화를 유도한다. 이 특정 조작된 면역 세포의 치료적 이점은 구성적 및 유도성 프로모터의 기능에 따라 달라진다. 예를 들어, 그러한 경우에, 이식유전자는 CAR 활성화 시 발현될 것이고 특히 종양에서 발현될 것이다.

[0165] 일 구현예에서, 본 발명은 3개 이상의 이식유전자를 발현시키는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 이식유전자 1은 구성적일 수 있으며 항원과 접촉한 직후 2개 이상의 추가 이식유전자가 들어올 수 있다. 특정 구현예에서, 이식유전자 1은 Dsg2에 특이적인 CAR을 인코딩한다. Dsg2에 결합한 후, 하나 이상의 추가 이식유전자가 발현된다. 일 구현예에서, 1개 이상의 추가 이식유전자는 종양 미세환경 내의 종양 세포 또는 다른 세포 상에서 또한 발현

되는 항원에 특이적인 또 다른 CAR을 인코딩한다. 이 예는 동일한 면역 세포에 의한 다른 CAR의 시간적/순차적 발현을 사용하는 "조합적 표적화"의 한 형태이다. 또 다른 특정 구현예에서, 이식유전자 1은 Dsg2에 특이적인 CAR을 인코딩하고; 이식유전자 2는 사이토카인을 인코딩하고, 이식유전자 3은 예를 들어 동일한 미세환경에서 항원 A 또는 세포를 발현하는 동일한 세포(예를 들어, 종양 세포)에서 항원을 인식하는 또 다른 사이토카인 또는 공동자극 리간드 또는 scFv를 인코딩한다. 이것은 종양 미세환경과 같은 미세 환경에 유전자 발현을 제한함으로써 면역 세포 효능과 안전성을 증가시키도록 설계된 순차적 유전자 활성화의 예이다.

[0166] 일 구현예에서, 유도성 프로모터는 면역 세포의 활성화에 의해 유도된다. 일 구현예에서, 유도성 프로모터는 예를 들어 그의 상응하는 항원과 상호작용 시에, 면역 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 키메라 공동자극 수용체(CCR)를 그의 각각의 결합 파트너에 결합시킴으로써 유도된다. CAR과 CCR 모두 세포 내 신호 전달 도메인을 함유한다. CAR의 경우, 세포내 신호 전달 도메인은 면역 세포를 활성화하고, 선택적으로 공동자극 도메인(2세대 및 3세대 CAR의 경우)을 함유한다(문헌[Sadelain 등, *Cancer Discov.* 3(4):388-398(2013)] 참조). CCR의 경우, 공동자극 신호는 함유하지만 면역 세포 활성화 신호를 갖지 않는다(Sadelain 등, *상동*, 2013). CAR 또는 CCR에 대한 상응하는 항원의 결합은 면역 세포 신호전달 도메인 및/또는 공동자극 도메인의 활성화를 초래한다. 이러한 신호전달 도메인의 활성화는 신호를 핵으로 전파하고 면역 세포에서 특정 내인성 프로모터의 활성화를 초래한다. CAR 또는 CCR의 세포내 신호전달 도메인은 CD28, 4-1BB, CD27, ICOS, CD3 ζ 등의 세포내 도메인 뿐만 아니라 본 명세서에 개시된 다른 세포내 신호전달 도메인을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 도메인의 돌연변이(예를 들어 돌연변이 ITAM), 말단 절단 또는 융합 버전에서도 신호전달이 발생할 수 있다.

[0167] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 각각의 결합 파트너에 대한, 면역 세포에 의해 발현되는 T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 4-1BB 등의 결합에 의해 유도된다. 이 분자는 세포 내 신호전달 도메인을 함유한다. 활성화 시, 신호전달 도메인의 활성화는 신호를 핵으로 전파하고 면역 세포에서 특정 내인성 프로모터의 활성화를 초래한다. 또 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 iCAR(PD1, CTLA4와 같은 억제성 세포내 도메인을 갖는 CAR) 또는 말단절단된 CAR(세포내 도메인 없음)의 결합에 의해 유도된다. 일 구현예에서, iCAR은 CTLA4 또는 PD1 세포내 도메인의 신호전달을 통해 표적과의 만남 시 면역 세포 활성화를 위한 '단절'하는 기능을 한다. 따라서 PD1 또는 CTLA4에 의해 조절되는 프로모터는 iCAR이 항원과 만날 때 이식유전자를 발현하는 데 사용될 수 있다.

[0168] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 면역 세포 상에서 발현되는 억제 수용체에 대한 리간드의 결합에 의해 유도된다. 예시적인 억제 수용체는 수용체 프로그래밍된 사망 1(PD-1), 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4), B- 및 T-림프구 감쇠체(BTLA), T 세포 면역글로불린 뮤진-3(TIM-3), 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3), 종양 괴사 인자(TNF) 관련 세포자멸 유도 리간드(TRAIL, 수용체 1 및 2), Fas, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체(TIGIT), 및 2B4(CD244)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 억제 수용체에 대한 상응하는 리간드는 예를 들어, (PD-1에 대한)PD-L1;(PD-1에 대한) PD-L2; CD80, (CTLA-4에 대한) CD86;(BTLA에 대한) HVEM; 갈락틴-9, (TIM-3에 대한) HMGB1;(LAG-3에 대한) MHC II;(TRAIL 수용체 1 및 TRAIL 수용체 2에 대한) TRAIL;(Fas에 대한) Fas 리간드(FasL) 등을 포함한다(문헌[Chen 등, *Nat. Rev. Immunol.* 13(4):227-242(2013); Tollefson 등, *J. Virol.* 75:8875-8887(2001); Waring 등, *Immunol. Cell Biol.* 77:312-317(1999)]참고)

[0169] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 면역 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에 대한 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 일 구현예에서, 사이토카인은 인터루킨 2(IL2), 인터루킨 7(IL7), 인터루킨 15(IL15) 및 인터루킨 21(IL21)로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역자극성 사이토카인이다.

[0170] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 대사산물에 의해 유도된다. 특정 구현예에서, 대사산물은 피루베이트, 글루타민, 베타-하이드록시부티레이트, 락테이트 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 대사산물은 면역 세포 활성화 중에 생성되거나 흡수되며, 이는 면역 세포의 대사 변화로 해석된다.

[0171] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 대사 변화에 의해 유도된다. 이것은 세포의 대사 상태를 나타낸다. 예를 들어 나이브 T 세포가 에너지를 생성하기 위해 산화적 인산화에 의존하고 활성화되어 이펙터 T 세포로 분화되면 에너지를 생성하기 위해 당분해로 전환된다. 저산소증 및 낮은 pH는 또한 대사 변화를 유도한다(Chang 등, *Nat. Immunol* 17:364-368(2016); McNamee 등, *Immunol. Res.* 55:58-70(2013)).

[0172] 다른 구현예에서, 유도성 프로모터는 특정 이온 농도와 같은 이온에 의해 유도된다. 일 구현예에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 이온에 의해 유도된 예시적인 프로모터는 NFAT-의존 방식으로 활성화되는 IL2, TNF알파 및 IFN감마의 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. NFAT는 세포내 칼슘의 증가된 수준에 의해 활성화된다.

[0173] 치료 이식유전자

[0174] 본 발명은 면역 세포에서 치료 이식유전자를 발현하기 위한 조성물에 관한 것이다. 치료 이식유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는 뉴클레오티드(예를 들어, DNA 또는 이의 변형된 형태) 서열이다. 면역 세포에 의해 발현될 때 치료 단백질 또는 치료 핵산은 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용된다. 치료 단백질은 RNA, 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0175] 이식유전자는 예를 들어 cDNA, 유전자, miRNA 또는 lncRNA 등을 인코딩할 수 있는 것으로 이해된다. 추가로, 이식유전자는 폴리시스트론성 메시지, 즉 배열된 cDNA 또는 배열된 miRNA일 수 있다. 하나의 예시적인 폴리시스트론성 이식유전자는 TCR 사슬이다. 폴리시스트론성 메시지는 면역 세포에서 조작되어 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 여러 이식유전자를 발현할 수 있다. 따라서, 3개의 선택된 유전자좌에서 3개의 바이시스트론성 이식유전자를 노킹함으로써 조작된 면역 세포에서 6개의 유전자 산물을 발현할 수 있다. 따라서, 다수의 이식유전자가 면역 세포에서 발현될 수 있으며(원하는 경우 1, 2, 3, 4, 5, 6개 등), 각각 별도의 내인성 프로모터의 제어 하에, 또는 일부 이식유전자(즉, 폴리시스트론성 이식유전자)와 함께 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 다수의 이식유전자는 구성적 프로모터 또는 유도물의 제어 하에 독립적으로 배치될 수 있다. 따라서, 구성적 및/또는 유도성 프로모터의 조합은 동일한 세포에서 다중 이식유전자를 발현시키기 위해 면역 세포에서 사용될 수 있다.

[0176] 일 구현예에서, 이식유전자는 폴리시스트론성, 예를 들어 바이시스트론성이다. 일 구현예에서, 이식유전자는 폴리시스트론성이고 하나 초과와 치료 단백질 또는 치료 RNA를 인코딩하며, 여기서 둘 다의 발현은 면역 세포의 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 특정 구현예에서, 이식유전자는 바이시스트론성이고 2개의 치료 단백질(예를 들어, scFv)을 인코딩하며, 여기서 scFv의 발현은 모두 면역 세포의 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다.

[0177] 키메라 항원 수용체(CAR)

[0178] 일 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 Dsg2에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0179] 다양한 구현예에서, CAR은 "1세대", "2세대", "3세대", "4세대" 또는 "5세대" CAR을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 CAR 분자일 수 있다 "1세대", "2세대", "3세대", "4세대" 또는 "5세대" CAR일 수 있다(예를 들어, 문헌[Sadelain 등, Cancer Discov. 3(4):388-398(2013); Jensen 등, Immunol. Rev. 257:127-133(2014); Sharpe 등, Dis. Model Mech. 8(4):337-350(2015); Brentjens 등, Clin. Cancer Res. 13:5426-5435(2007); Gade 등, Cancer Res. 65:9080-9088(2005); Maher 등, Nat. Biotechnol. 20:70-75(2002); Kershaw 등, J. Immunol. 173:2143-2150(2004); Sadelain 등, Curr. Opin. Immunol.(2009); Hollyman 등, J. Immunother. 32:169-180(2009))] 참조).

[0180] 본 발명에서 사용하기 위한 "1세대" CAR은 Dsg2 결합 도메인, 예를 들어 T 세포 수용체 사슬의 세포질/세포내 도메인에 융합된 막횡단 도메인에 융합된 단쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. "1세대" CAR은 전형적으로 내인성 T 세포 수용체(TCR)의 신호의 일차 전달자인 CD3 ζ -사슬의 세포내 도메인을 가지고 있다. "1세대" CAR은 새로운 항원 인식을 제공할 수 있으며 HLA 매개 항원 제시와 독립적으로 단일 융합 분자에서 CD3 ζ 사슬 신호전달 도메인을 통해 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두의 활성화를 유발할 수 있다.

[0181] 본 발명에서 사용하기 위한 "2세대" CAR은 Dsg2 결합 도메인, 예를 들어 T 세포를 활성화할 수 있는 세포내 신호전달 도메인 및 T 세포 효능 및 지속성을 증강시키도록 설계된 공동자극 도메인에 융합된 단쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다(Sadelain 등, Cancer Discov. 3:388-398(2013)). 따라서 CAR 설계는 TCR 이중이량체와 CD3 복합체라는 2개의 개별 복합체에 의해 생리학적으로 발생하는 두 가지 기능인 신호 전달과 항원 인식을 조합할 수 있다. "2세대" CAR은 세포에 추가적인 신호를 제공하기 위해 CAR의 세포질 테일에 다양한 공동자극 분자, 예를 들어 CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 등의 세포내 도메인을 포함한다.

[0182] "2세대" CAR은 예를 들어 CD28 또는 4-1BB 도메인에 의한 공동자극 및 예를 들어 CD3 ζ 신호전달 도메인에 의한 활성화를 모두 제공한다. 전임상 연구는 "2세대" CAR이 T 세포의 항종양 활성을 개선할 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, "2세대" CAR 변형 T 세포의 강력한 효능은 만성 림프모구성 백혈병(CLL) 및 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 환자의 CD19 분자를 표적으로 하는 임상 시험에서 입증되었다(Davila 등, Oncoimmunol. 1(9):1577-1583(2012)).

- [0183] "3세대" CAR은 예를 들어 CD28 및 4-1BB 도메인 모두를 포함함으로써 다중 공동-자극 및 예를 들어 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함함으로써 활성화를 제공한다.
- [0184] "4세대" CAR은 예를 들어 CD28 또는 4-1BB 도메인에 의한 공동자극 및 예를 들어 구성적 또는 유도성 케모카인 성분에 더하여 CD3 ζ 신호전달 도메인에 의한 활성화를 제공한다.
- [0185] "5세대" CAR은 예를 들어 CD28 또는 4-1BB 도메인에 의한 공동자극, 및 예를 들어 CD3 ζ 신호전달 도메인, 구성적 또는 유도성 케모카인 성분 및 사이토카인 수용체, 예를 들어, IL-2R β 의 세포내 도메인에 의한 활성화를 제공한다.
- [0186] 다양한 구현예에서, CAR은 다가 CAR 시스템, 예를 들어 DualCAR 또는 "TandemCAR" 시스템에 포함될 수 있다. 다가 CAR 시스템은 다중 CAR을 포함하는 시스템 또는 세포 및 하나 초과의 항원을 표적으로 하는 2가/이중특이적 CAR을 포함하는 시스템 또는 세포를 포함한다.
- [0187] 본 명세서에 개시된 구현예에서, CAR은 일반적으로 전술된 바와 같이 Dsg2 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 특정 비-제한적 구현예에서, Dsg2 결합 도메인은 scFv이다.
- [0188] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 발명의 방법은 CAR을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 수반한다. CAR의 세포의 항원 결합 도메인은 일반적으로 단클론성 항체(mAb) 또는 수용체 또는 그 리간드로부터 유래한다.
- [0189] Dsg2에 대한 CAR은 본 명세서에 기재된 바와 같은 것을 포함하는 CAR 설계를 위한 잘 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 1세대, 2세대, 3세대, 4세대 또는 5세대 CAR이건 CAR은 항원 결합 도메인, 또는 Dsg2 결합 분자, 예컨대 Dsg2-scFv 항체를 면역 세포 신호전달 도메인, 예컨대 T 세포 수용체 세포질/세포내 도메인에 융합 시킴으로써 용이하게 설계될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, CAR은 일반적으로 T 세포에서 세포 신호전달 활성을 갖는 세포내 도메인에 융합되는 막횡단 도메인에 융합된 세포의 도메인의 적어도 일부로서 scFv와 같은 항원 결합 활성을 갖는 세포 표면 수용체의 구조를 갖는다. CAR은 본 명세서에 기재된 바와 같이 공동자극 분자를 포함할 수 있다. 당업자는 T 세포에서 원하는 신호전달 능력을 제공하기 위해 본 명세서에 기재되고 당업계에 공지된 바와 같은 적절한 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 쉽게 선택할 수 있다.
- [0190] 일 구현예에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 도메인 또는 Dsg2 결합 분자는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 항체는 면역글로불린, 예를 들어, IgG로서, 또는 이중특이적 T-세포 연관체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재표적화 항체(DART), Fab, F(ab' 단쇄 가변 단편(scFv), 나노바디, 이중특이적 항체, 등으로서 발현될 수 있다.
- [0191] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 또는 Dsg2 결합 분자는 scFv 또는 Fab, 또는 항체의 임의의 적합한 항원 결합 단편일 수 있다(문헌[Sadelain 등, Cancer Discov. 3:38-398(2013) 참고]. 암 항원과 같은 항원에 결합하는 항체로부터 유래된 많은 항체 또는 항원 결합 도메인이 당업계에 공지되어 있다. 대안적으로, 그러한 항체 또는 항원 결합 도메인은 통상적인 방법에 의해 생산될 수 있다. 항체를 생성하는 방법은 단클론성 항체를 생산하거나 인간 Fab의 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함하여 항원 결합 폴리펩티드를 얻기 위해 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 포함하여 당업계에 잘 알려져 있다(Winter 및 Harris, Immunol. Today 14:243-246(1993); Ward 등, Nature 341:544-546(1989); Harlow 및 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988); Hilyard 등, Protein Engineering: A practical approach(IREL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2nd ed.(Oxford University Press 1995); Huse 등, Science 246:1275-1281(1989)). CAR의 경우, 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인은 필요에 따라 인간, 인간화, 키메라, CDR 이식 등이 될 수 있다. 예를 들어, 마우스 단클론성 항체가 CAR의 항원 결합 도메인을 생성하기 위한 소스(source) 항체인 경우, 이러한 항체는 마우스 항체의 CDR을 인간 프레임워크에 이식함으로써 인간화될 수 있고(문헌[Borrabeck, 상동, 1995] 참고), 이는 인간 대상체에게 CAR을 투여하는 데 유익할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항원 결합 도메인은 scFv이다. scFv의 생성은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Huston, 등, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); Ahmad 등, Clin. Dev. Immunol. 2012: ID980250(2012); 미국 특허 번호 5,091,513, 5,132,405 및 4,956,778; 및 미국 특허 공개 제20050196754호 및 제20050196754호] 참고).
- [0192] CAR에 특히 유용한 Dsg2에 결합하는 scFv의 생성을 포함하여, 본 명세서에 개시된 바와 같이 Dsg2에 결합하는 항체를 생성 및 스크리닝하기 위해 잘 알려진 방법이 사용될 수 있다.
- [0193] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 하기 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC)

CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 14의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 하기 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 18의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열.

[0194] 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 8에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 16에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 8의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 16의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0195] 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 24에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 32에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자, 또는 그의 단편은 서열번호: 24의 중쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 서열번호: 32의 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0196] 일 구현예에서, 본 발명은 Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 인코딩한다: 서열번호: 2의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 4의 HC CDR2 서열, 서열번호: 6의 HC CDR3 서열, 서열번호: 10의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 12의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 14의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 1의 중쇄(HC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 3의 HC CDR2 인코딩 서열, 서열번호: 5의 HC CDR3 인코딩 서열, 서열번호: 9의 경쇄(LC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 11의 LC CDR2 인코딩 서열, 및 서열번호: 13의 LC CDR3 인코딩 서열.

[0197] 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 인코딩한다: 서열번호: 18의 중쇄(HC) CDR1 서열, 서열번호: 20의 HC CDR2 서열, 서열번호: 22의 HC CDR3 서열, 서열번호: 26의 경쇄(LC) CDR1 서열, 서열번호: 28의 LC CDR2 서열, 및 서열번호: 30의 LC CDR3 서열. 일 구현예에서, Dsg2 지정 CAR 분자 또는 그의 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 하기 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다: 서열번호: 17의 중쇄(HC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 19의 HC CDR2 인코딩 서열, 서열번호: 21의 HC CDR3 인코딩 서열, 서열번호: 25의 경쇄(LC) CDR1 인코딩 서열, 서열번호: 27의 LC CDR2 인코딩 서열, 및 서열번호: 29의 LC CDR3 인코딩 서열.

[0198] 상기 기재된 바와 같이, CAR은 또한 CAR을 발현하는 면역 세포에서 기능하는 신호전달 도메인을 함유한다. 그러한 신호전달 도메인은 예를 들어 CD3 ζ 또는 Fc 수용체 γ 로부터 유래될 수 있다(문헌[Sadelain 등, Cancer Discov. 3:288-298(2013)] 참고). 일반적으로, 신호전달 도메인은 형질도입된 면역 세포 또는 이의 전구 세포에서 지속성, 트래피킹 및/또는 이펙터 기능을 유도할 것이다(Sharpe 등, Dis. Model Mech. 8:337-350(2015); Finney 등, J. Immunol. 161:2791-2797(1998); Krause 등, J. Exp. Med. 188:619-626(1998)). CD3 ζ 또는 Fc 수용체 γ 의 경우, 신호전달 도메인은 각각의 폴리펩티드의 세포내 도메인 또는 신호전달에 충분한 세포내 도메인의 단편에 해당한다. 예시적인 신호전달 도메인은 아래에 더 자세히 설명되어 있다.

[0199] 일 구현예에서, CAR 분자는 서열번호: 34에 기재된 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, CAR 분자는 서열번호: 36에 기재된 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0200] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR 분자의 변이체는 서열번호: 34 또는 서열번호: 36의 아미노산 서열의 전장에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다.

[0201] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR 분자의 단편은 서열번호: 34 또는 서열번호: 36의 전장 아미노산 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다.

[0202] 일 구현예에서, CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 34에 제시된 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체

를 인코딩한다. 일 구현예에서, CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 36에 제시된 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩한다.

[0203] 일 구현예에서, CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 33에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, CAR 분자를 인코딩하는 핵산 분자는 서열번호: 35에 기재된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 변이체는 서열번호: 33 또는 서열번호: 35의 뉴클레오티드 서열의 전장에 대해 적어도 약 60% 동일성, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성을 포함한다.

[0205] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 단편은 서열번호: 33 또는 서열번호: 35의 전장 뉴클레오티드 서열의 적어도 약 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다.

[0206] CD3 ζ

[0207] 비-제한적 구현예에서, CAR은 CD3 ζ 폴리펩티드로부터 유래된 신호전달 도메인, 예를 들어 면역 세포를 활성화 또는 자극할 수 있는 CD3 ζ 의 세포내 도메인으로부터 유래된 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. CD3 ζ 는 3개의 면역-수용체-티로신 기반 활성화-모티프(ITAM)를 포함하고, 항원이 결합된 후 활성화 신호를 세포, 예를 들어 T 세포와 같은 림프양 계통의 세포로 전달한다. "CD3 ζ 핵산 분자"는 CD3 ζ 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭하는 것으로 이해된다.

[0208] 특정 비-제한적 구현예에서, CAR의 세포내 도메인은 적어도 하나의 공동자극 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 공동자극 신호전달 도메인은 면역 세포의 증가된 활성화를 제공할 수 있다. 공동자극 신호전달 도메인은 CD28 폴리펩티드, 4-1BB 폴리펩티드, OX40 폴리펩티드, ICOS 폴리펩티드, DAP10 폴리펩티드, 2B4 폴리펩티드 등으로부터 유도될 수 있다. 일부 구현예에서, CAR의 세포내 도메인은 본 명세서에서 개시된 바와 같은 2개의 공동자극 분자, 예컨대 CD28 및 4-1BB, 또는 CD28 및 OX40, 또는 공동자극 리간드의 다른 조합을 포함하는 공동자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다.

[0209] 신호 펩티드

[0210] 일부 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 초기 단백질을 소포체 내로 유도하고 이어서 세포 표면으로 전위시키는 리더 또는 신호 펩티드에 융합될 수 있다. 일단 신호 펩티드를 함유하는 폴리펩티드가 세포 표면에서 발현되면, 신호 펩티드는 일반적으로 소포체에서 폴리펩티드의 프로세싱 및 세포 표면으로의 전좌 동안 단백질분해에 의해 제거되는 것으로 이해된다. 따라서, 일부 구현예에서, CAR과 같은 폴리펩티드는 신호 펩티드가 결합된 성숙 단백질로서 세포 표면에서 발현되는 반면, 폴리펩티드의 전구체 형태는 신호 펩티드를 포함한다. 신호 서열 또는 리더는 분비 경로로의 진입을 지시하는 새로 합성된 단백질의 N-말단에 일반적으로 존재하는 펩티드 서열이다. 신호 펩티드는 융합 단백질로서 CAR의 세포외 항원 결합 도메인의 N-말단에 공유 결합된다. 당업계에서 잘 알려진 임의의 적합한 신호 펩티드는 면역 세포에서 세포 표면 발현을 제공하기 위해 CAR에 적용될 수 있다(문헌[Gierasch Biochem. 28:923-930(1989); von Heijne, J. Mol. Biol. 184(1):99-105(1985)] 참고). 예시적인 신호 펩티드는 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 임의의 신호 펩티드를 포함하여 면역 세포에서 자연적으로 발현되는 세포 표면 단백질로부터 유래될 수 있다. 따라서, 임의의 적합한 신호 펩티드는 CAR이 면역 세포의 세포 표면에서 발현되도록 지시하기 위해 이용될 수 있다.

[0211] 일 구현예에서, CAR 분자는 다음을 포함한다.

[0212] 링커

[0213] 특정 비-제한적 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 연결하는 링커 서열 또는 펩티드 링커를 포함할 수 있다. 특정 비-제한적 구현예에서, CAR은 또한 CAR의 도메인을 서로 연결하는 스페이서 영역 또는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 스페이서는 신호 펩티드와 항원 결합 도메인 사이, 항원 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이, 막횡단 도메인과 세포내 도메인 사이, 및/또는 세포내 도메인 내의 도메인 사이, 예를 들어, 자극 도메인과 공동자극 도메인 사이 포함될 수 있다. 스페이서 영

역은 예를 들어 항원 결합 도메인이 항원 인식을 용이하게 하기 위해 배향에 유연성을 갖도록 다양한 도메인과 다른 폴리펩티드의 상호작용을 허용하기에 충분히 유연할 수 있다. 스페이서 영역은 예를 들어 IgG의 힌지 영역, 면역글로불린의 CH2CH3(불변) 영역 및/또는 CD3(분화 3의 클러스터)의 일부 또는 스페이서로 적합한 일부 다른 서열일 수 있다.

[0214] 일부 구현예에서, CAR의 막횡단 도메인은 막의 적어도 일부에 걸쳐 있는 소수성 알파 나선을 포함한다. 상이한 막횡단 도메인은 상이한 수용체 안정성을 초래한다. 항원 인식 후, 수용체는 클러스터링되고 신호는 세포로 전달된다. 한 구현예에서, CAR의 막횡단 도메인은 면역 세포에서 자연적으로 발현되는 또 다른 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, CAR은 CD8, CD28, CD3, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, 2B4, BTLA, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같거나 당업계에 널리 공지된 다른 것을 포함하는 막횡단 도메인을 갖는 면역 세포에서 발현되는 다른 폴리펩티드로부터 유래된 막횡단 도메인을 가질 수 있다. 선택적으로, 막횡단 도메인은 막횡단 도메인이 CAR에 결합된 항원으로부터의 신호를 세포내 신호전달 및/또는 공동-자극 도메인으로 전달하는데 기능할 수 있는 한, 면역 세포에서 자연적으로 발현되지 않는 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 폴리펩티드의 막횡단 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 부분은 원하는 대로 폴리펩티드로부터의 추가 서열, 예를 들어 막횡단 도메인의 N-말단 또는 C-말단 말단에 인접한 추가 서열, 또는 폴리펩티드의 다른 영역을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0215] 본 명세서에 기재된 폴리펩티드의 도메인은 신호 펩티드, 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 세포내 신호전달 도메인 및/또는 동시자극 도메인과 같은 원하는 기능을 제공하는 데 유용한 암 항원 CAR에 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 본 발명의 CAR에 특정 기능을 제공하기 위해 원하는 경우 신호 펩티드, 막횡단 도메인, 세포내 신호전달 도메인, 또는 다른 도메인과 같은 도메인이 선택될 수 있다. 가능한 바람직한 기능은 신호 펩티드 및/또는 막횡단 도메인을 제공하는 것을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0216] 키메라 공동자극 수용체(CCR)

[0217] 일부 구현예에서, 본 발명은 키메라 공동자극 수용체(CCR)를 제공한다. 키메라 동시자극 수용체(CCR)는 CAR과 유사하게 항원 결합 세포의 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 수용체이다 (Sadelain 등, Cancer Discov. 3(4):388-398(2013)). CCR은 T 세포 활성화 도메인을 갖지 않지만, 예를 들어 CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP10, 2B4, CD70, 등과 같이 CAR에 대해 전술한 공동자극 도메인 중 하나와 같은 공동자극 도메인을 포함한다. CCR은 이중 항원 발현 T 세포에 대한 T 세포 반응성을 강화하기 위해 T 세포 수용체 또는 CAR과 함께 사용될 수 있다(Sadelain 등, 상동, 2013). CCR은 선택적 종양 표적화를 강화하기 위해 사용될 수도 있다(Sadelain 등, 상동, 2013). CCR은 결합 파트너, 즉 표적 항원에 결합할 때 4-1BB, OX40, ICOS 또는 CD70(CCR의 공동자극 도메인에 따라 다름) 효과를 모방하는 항원 특이적 공동자극 수용체이다.

[0218] 우세한 음성 iCAR

[0219] 일 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자는 본 발명의 T 세포의 활성화를 자극하거나 지속시키는 우성 음성 분자를 포함한다. 예시적인 우성 음성 분자는 억제 키메라 항원 수용체(iCAR), (예를 들어, TGFβ, IL10에 대한) 분비가능한 가용성 사이토카인 수용체, 분비가능한 가용성 T-세포 억제 수용체(예를 들어, PD1, CTLA4, LAG3, 또는 TIM-3로부터 유래됨), 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서 iCAR은 억제 T 세포 수용체(PD1, CTLA4와 같은)로부터 유래된 세포내 신호전달 도메인에 융합된 Dsg2 결합 분자(예를 들어, Dsg2-scFv)로 구성된 세포 표면 수용체이다. 조작된 T 세포는 표적 세포와의 상호작용 시 억제된다.

[0220] 유전적 회로

[0221] 일 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자, CAR 또는 CCR은 유전적 회로에 통합된다. 유전적 회로는 기능적으로 연결된 유전자 발현 단위 단위이다.

[0222] 한 구현예에서, 유전적 회로는 세포-표면 리간드 특이적 합성 전사 인자(TF)를 발현하는 구성적 전사 단위를 포함하며, 여기서 리간드 결합시 TF 모이어티가 방출되어 핵으로 전좌된다. 그 다음 TF는 핵에서 동족 DNA 서열에 결합하여 유전자 발현을 활성화한다. 일 구현예에서, 세포-표면 리간드 특이적 합성 전사 인자(TF)는 Dsg2에 결합하는 데 특이적이다.

[0223] 본 발명의 Dsg2 결합 분자, CAR 또는 CCR을 통합할 수 있는 유전적 회로의 예는 SynNotch 회로, NFAT 회로 및 HIF1α 회로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0224] 다른 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자, CAR 또는 CCR은 로직-게이트 시스템에 통합된다. 본 발명의 Dsg2

결합 분자, CAR 또는 CCR을 포함할 수 있는 로직-게이트 CAR 시스템은 국제 특허 출원 공개 WO2015075469A1에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0225] 융합 분자

[0226] 일 구현예에서, Dsg2 결합 분자는 융합 분자를 제조하기 위해 다른 단백질, 핵산 분자 또는 소분자에 접합된다. 이는 예를 들어 생성된 융합 단백질이 본 명세서에 기재된 바와 같이 Dsg2에 대한 결합 기능을 유지한다면 N-말단 또는 C-말단 융합 단백질의 합성에 의해 달성될 수 있다. 적어도 하나의 다른 분자와 접합된 본 발명의 펩티드 또는 단백질을 포함하는 N-말단 또는 C-말단 융합 단백질은 재조합 기술을 통해 펩타이드 또는 단백질의 N-말단 또는 C-말단 및 원하는 생물학적 기능을 가진 선택된 단백질 또는 선택 가능한 마커의 서열을 융합하여 제조될 수 있다. 생성된 융합 단백질은 본 명세서에 기재된 선택된 단백질 또는 마커 단백질에 융합된 본 발명의 펩티드를 함유한다.

[0227] 본 발명은 또한 융합 단백질을 포괄하고, 여기서 본 발명의 단백질 또는 그의 단편이 이중 단백질(즉, 즉, 관련 없는 단백질 또는 그의 부분, 예를 들어, 폴리펩티드의 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개의 아미노산)에 재조합으로 융합되거나 화학적으로 접합(공유 및 비-공유 접합 모두 포함)되어 융합 단백질을 생성한다. 융합은 반드시 직접적일 필요는 없지만 링커 서열을 통해 발생할 수 있다.

[0228] 따라서, 일부 구현예에서 본 발명은 하나 이상의 치료 분자에 융합된 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 포함하는 융합 분자를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 융합 분자는 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 포함하는 항체-약물 접합체이다. 일 구현예에서, 치료 분자는 암 치료제를 포함한다.

[0229] 사용 방법

[0230] 일부 구현예에서, 본 발명의 Dsg2 결합 분자(예를 들어, 항체 등)는 염, 화합물 및 다른 폴리펩티드의 복합 혼합물에서 Dsg2를 검출하고 결합하는 높은 능력을 나타낸다. 당업자는 본 명세서에 기재된 Dsg2 결합 분자(예를 들어, 항체 등)가 면역크로마토그래피 검정, 면역도트 검정, Luminex 검정, ELISA 검정, ELISPOT 검정, 단백질 마이크로어레이 검정, 웨스턴 블롯 검정, 질량 분광광도법 검정, 방사선면역검정(RIA), 방사선면역확산 검정, 액체 크로마토그래피-텐덤 질량 분광분석 검정, 오우크테를로니(ouchterlony) 면역확산 검정, 역상 단백질 마이크로어레이, 로켓(rocket) 면역전기영동 검정, 면역조직염색 검정, 면역침강 검정, 보체 고정 검정, FACS, 단백질 칩 검정, 분리 및 정제 공정, 및 친화성 크로마토그래피를 포함하지만 이에 제한되지 않는 절차 및 방법에 유용함을 이해할 것이다(또한 문헌[2007, Van Emon, Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques, CRC Press; 2005, Wild, Immunoassay Handbook, Gulf Professional Publishing; 1996, Diamandis 및 Christopoulos, Immunoassay, Academic Press; 2005, Joos, Microarrays in Clinical Diagnosis, Humana Press; 2005, Hamdan 및 Righetti, Proteomics Today, John Wiley 및 Sons; 2007] 참고).

[0231] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 Dsg2 결합 분자, 또는 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 대상체에게 투여하는 방법에 관한 것이다. 한 구현예에서 본 발명의 Dsg2 결합 분자는 암을 진단하거나 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0232] 다음은 개시된 방법 및 조성물에 의해 진단되거나 치료될 수 있는 암의 비-제한적 예이다: 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, 맹장암, 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 골암, 뇌 및 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌종양, 유방암, 기관지 종양, 버킷 림프종, 유암종, 중추신경계 비전형 기형/황문근양 종양, 중추신경계 배아 종양, 중추신경계 림프종, 소뇌 정상세포종, 대뇌 정상세포종/악성 신경교종, 대뇌 별아교세포종/악성 신경교종, 자궁경부암, 소아기 시각적 경로 종양, 척색종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수형성 백혈병, 만성 골수증식성 장애, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 피부 암, 피부 T-세포 림프종, 자궁내막 암, 상의 모세포종, 뇌실막세포종, 식도암, 유잉 계열의 종양, 두개의 암, 고환외 생식 세포 종양, 간의 담도암, 간의 암, 안암, 진균모양, 담낭암, 위(위) 암, 위장암, 위장 유암종, 위장 간질성 종양(요지), 생식 세포 종양, 임신성 암, 임신성 용모성 종양, 교모세포종, 신경교종, 모발 세포 백혈병, 두경부암, 간세포(간) 암, 조직구증, 호지킨 림프종, 하인두 암, 시상하부 및 시각적 경로 신경교종, 시상하부 종양, 안구내(눈) 암, 안구내 흑색종, 소도 세포 종양, 카포시 육종, 신장(신장 세포) 암, 랑게르한스 세포 암, 랑게르한스 세포 조직구증, 후두 암, 백혈병, 입술 및 구강 암, 간암, 폐암, 림프종, 거대글로불린혈증, 뼈의 악성 섬유질 조직구증 및 골육종, 수모 세포종, 수질상피종, 흑색종, 머켈 세포 암종, 중피종, 잠복 원발성을 갖는 전이성 편평상피 목암, 구강암, 다중 내분비 신조직형성 증후군, 다발성 골수종, 진균증, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 질환, 골수

형성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수종, 골수증식성 장애, 비강 및 부비동 암, 비인두 암, 신경교세포종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 구강암, 구강 암, 구강인두 암, 골육종 및 악성 섬유질 조직구종, 골육종 및 뼈, 난소의 악성 섬유질 조직구종, 난소암, 난소 상피 암, 난소 생식 세포 종양, 난소 낮은 악성 잠재적 종양, 췌장암, 유두종종, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두 암, 크롬친화세포종, 중간 분화의 송과체 실질 종양, 송과체모세포종 및 천막상 원시적인 신경외배엽 종양, 너하수체 종양, 형질 세포 신생물, 형질 세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐 아세포종, 원발성 중추신경계 암, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신장 세포(신장) 암, 신우 및 요관 암, 염색체 15에 대한 nut 유전자를 수반하는 기도 암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선 암, 육종, 세자리 증후군, 피부암(흑색종), 피부암(비흑색종), 피부 암종, 소세포 폐암, 소장 암, 연조직 암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 편평상피 목암, 위(위) 암, 천막상 원시적인 신경외배엽 종양, 천막상 원시적인 신경외배엽 종양 및 송과체모세포종, T-세포 림프종, 고환암, 인후두암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 이행 세포 암, 신우 및 요관의 이행 세포 암, 융모성 종양, 요도 암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 시각적 경로 및 시상하부 신경교종, 외음부암, 발덴스트롬 거대글로블린혈증, 및 윌름스 종양.

[0233] 본 발명은 또한 면역요법으로 면역요법을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서 면역요법은 면역 반응을 촉진한다. 일부 구현예에서, 치료 대상은 암 또는 전암을 가질 수 있고, 본 발명의 재조합 면역 세포의 투여는 암을 치료하거나 암의 진행을 예방하기 위한 것이다. 면역 세포는 Dsg2 결합 분자(예를 들어, CAR 또는 항체)를 재조합적으로 발현함으로써 암에 표적화될 수 있다. 일부 구현예에서 CAR은 종양 세포 상에서 발현된 Dsg2에 결합하고 본 발명의 재조합 면역 세포의 투여는 암을 치료한다. 일 구현예에서, 재조합 면역 세포는 T 세포이다. T 세포는 CD8+, CD4+, TSCM, TCM, 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, 또는 본 명세서에서 개시된 바와 같은 다른 T 세포일 수 있다.

[0234] 암을 치료하는 방법은 암과 연관된 징후 또는 증상을 개선하는 임의의 효과를 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 징후 또는 증상은 암세포 수 감소, 종양의 성장 억제를 포함하는 종양 부하 감소, 종양의 성장 속도 늦춤, 종양 크기 감소, 종양 수 감소, 종양 제거를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 이들 모두는 당업계에 잘 알려진 통상적인 종양 영상화 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 암과 연관된 다른 징후 또는 증상에는 피로, 통증, 체중 감소 및 다양한 암과 연관된 기타 징후 또는 증상이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명의 세포의 투여는 대상체에서 종양 세포의 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고/시키거나 종양을 박멸할 수 있다. 종양은 혈액암 또는 고형 종양일 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 암이 있는 대상체의 증가된 또는 연장된 생존을 제공할 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법은 대상체에서 증가된 면역 반응, 예를 들어 암에 대한 증가된 면역 반응을 제공할 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 본 발명의 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 면역 반응을 유도하기 위해 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, 본 발명의 세포는 Dsg2에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 인간 대상체와 같은 대상체에게 투여된다.

[0236] 일부 구현예에서, 암은 고형 종양을 수반할 수 있다. 본 발명의 세포를 사용하여 치료될 암은 전형적으로 면역요법에 반응하는 암을 포함한다. 암의 예시적인 유형은 부신피질 암종(ACC); 방광 요상피 암종(BLCA); 유방 침습성 암종(BRCA); 자궁경부 편평 세포 암종 및 자궁경내 선암종(CESC); 담관 암종(CHOL); 결장 선암종(COAD); 림프양 신생물 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBC); 식도 암종(ESCA); 다형성 교모세포종(GBM); 두경부 편평 세포 암종(HNSC); 신장 협색소(KICH); 신장 신장 맑은 세포 암종(KIRC); 신장 신장 유두상 세포 암종(KIRP); 급성 골수성 백혈병(LAML); 뇌 저급 신경교종(LGG); 간 간세포 암종(LIHC); 폐 선암종(LUAD); 폐 편평 세포 암종(LUSC); 중피종(MESO); 다발성 골수종(MM); 난소 장액성 낭상암종(OV); 췌장 선암종(PAAD); 크롬친화세포종 및 부신경절종(PCPG); 전립선 선암종(PRAD); 직장 선암종(READ); 육종(SARC); 피부 흑색종(SKCM); 위 선암종(STAD); 고환 생식 세포 종양(TGCT); 갑상선 암종(THCA); 흉선종(THYM); 자궁 체부 자궁내막암종(UCEC); 자궁 암육종(UCS); 또는 포도막 흑색종(UVM)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0237] 치료를 위해, 투여되는 양은 원하는 효과를 내기에 효과적인 양이다. 유효량 또는 치료적 유효량은 치료 시 유익하거나 원하는 임상 결과를 제공하기에 충분한 양이다. 유효량은 단일 투여 또는 일련의 투여(1회 이상의 용량)로 제공될 수 있다. 유효량은 볼러스로 또는 연속 관류에 의해 제공될 수 있다. 치료 측면에서, 유효량은 질환의 진행을 완화, 개선, 안정화, 역전 또는 지연시키거나 질환의 병리학적 결과를 감소시키기에 충분한 양이다. 유효량은 특정 대상체에 대해 의사가 결정할 수 있다. 유효량을 달성하기 위해 적절한 복용량을 결정할 때 전형적으로 몇 가지 요인이 고려된다. 이러한 요인에는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료할 병태, 병태의

증중도 및 투여되는 본 발명의 세포의 형태 및 유효 농도가 포함된다.

- [0238] 본 발명의 세포는 일반적으로 체중 킬로그램당 세포(세포/kg)를 기준으로 한 용량으로 투여된다. 일반적으로 세포 용량은 투여 방식 및 위치에 따라 체중의 약 10^4 내지 약 10^{10} , 예를 들어, 약 10^5 내지 약 10^9 , 약 10^5 내지 약 10^8 , 약 10^5 내지 약 10^7 , 또는 약 10^5 내지 10^6 세포/체중 kg의 범위이다. 일반적으로, 전신 투여의 경우, 본 발명의 면역 세포가 국소, 장기 또는 종양에 투여되는 국소 투여보다 더 높은 용량이 사용된다. 예시적인 용량 범위는 1×10^4 내지 1×10^8 , 2×10^4 내지 1×10^8 , 3×10^4 내지 1×10^8 , 4×10^4 내지 1×10^8 , 5×10^4 내지 1×10^8 , 6×10^4 내지 1×10^8 , 7×10^4 내지 1×10^8 , 8×10^4 내지 1×10^8 , 9×10^4 내지 1×10^8 , 1×10^5 내지 1×10^8 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 용량 범위는 국소 투여에 특히 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 국소 투여, 예를 들어 늑막내 투여를 위해 1×10^5 내지 5×10^6 , 특히 1×10^5 내지 3×10^6 또는 3×10^5 내지 3×10^6 세포/kg의 용량으로 제공된다. 용량은 또한 단일 용량이 투여되는지 또는 다중 용량이 투여되는지를 설명하기 위해 조정될 수 있다. 유효 용량으로 간주되는 것의 정확한 결정은 전술한 바와 같이 특정 대상체의 크기, 연령, 성별, 체중 및 병태를 포함하여 각 대상체에 대한 개별적인 요인을 기반으로 할 수 있다. 복용량은 본 개시내용 및 당업계의 지식에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0239] 본 발명의 세포는 늑막 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 척추강내 투여, 늑막내 투여, 복강내 투여, 두개내 투여, 및 흉선에 직접 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당해 분야에서 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 세포는 간 또는 대동맥 펌프; 사지, 폐 또는 간 관류; 문맥에서; 정맥 단락을 통해; 공동 또는 종양 근처의 정맥 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 잘 알려진 방법을 사용하여 장기, 종양 또는 자가면역 질환 부위 또는 감염성 질환 부위에 국소적으로 전달될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 세포는 전신으로 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는 예를 들어 종양 부위와 같은 원하는 요법 부위에 국소적으로 투여된다. 종양의 경우, 세포는 또한 예를 들어 종양 부위 및/또는 종양 맥관구조 내로 세포를 직접 주사함으로써 종양내로 투여될 수 있다. 당업자는 치료할 표적 조직 또는 표적 영역의 유형 및/또는 표적 조직 또는 표적 영역의 위치에 기초하여 적합한 투여 방식을 선택할 수 있다. 세포는 주사 또는 카테터에 의해 도입될 수 있다. 선택적으로, 확장제 및/또는 분화제는 생체내에서 본 발명의 세포의 생산을 증가시키기 위해 세포 투여 전, 동안 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0240] 일부 구현예에서, 본 발명의 세포의 증식은 대상체에게 투여하기 전에 생체외에서, 또는 대상체에게 투여한 후 생체내에서 수행된다(문헌[Kaiser 등, Cancer Gene Therapy 22:72-78(2015)] 참조).
- [0241] 본 발명의 방법은 본 발명의 세포로 치료하기 전, 치료하는 동안 또는 치료한 후에 보조 요법을 병용하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포 요법 방법은 본 발명의 세포의 투여와 양립할 수 있는 다른 표준 케어(care) 및/또는 요법과 함께 사용될 수 있다.
- [0242] 약제학적 조성물
- [0243] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 Dsg2 결합 분자, CAR 또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 유효량의 본 발명의 Dsg2 결합 분자, CAR 또는 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어 전형적으로 세포 현탁액을 갖는 등장성 수용액으로 편리하게 제공될 수 있거나, 선택적으로 전형적으로 선택된 pH로 완충되는 에멀전, 분산액 등으로서 제공될 수 있다. 조성물은 세포의 온전성 및 생존력 및 세포 조성물의 투여에 적합한 담체, 예를 들어 물, 식염수, 인산염 완충 식염수 등을 포함할 수 있다.
- [0244] 멸균 주사가능 용액은 필요에 따라 다양한 양의 기타 성분과 함께 적절한 양의 적절한 용매에 본 발명의 조성물을 혼입함으로써 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 세포 조성물과 함께 사용하고 인간과 같은 대상체에 투여하기에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제 예컨대 멸균수, 생리식염수, 글루코스, 텍스트로스 등을 포함할 수 있다. 세포 조성물을 제공하기 위한 적합한 완충액은 당업계에 잘 알려져 있다. 사용된 모든 비히클, 희석제 또는 첨가제는 본 발명의 세포의 무결성 및 생존력을 보존하는 데 적합하다.
- [0245] 일부 구현예에서, 조성물은 등장성, 즉 혈액과 동일한 삼투압을 갖는다. 본 발명의 세포 조성물의 원하는 등장은 염화나트륨, 또는 텍스트로스, 붕산, 타르타르산나트륨 또는 기타 무기 또는 유기 용질과 같은 기타 약제학적으로 허용되는 제제를 사용하여 달성될 수 있다. 염화나트륨은 특히 나트륨 이온을 함유하는 완충액에 바람직하다. 특히 유용한 완충액 중 하나는 식염수, 예를 들어 일반 식염수이다. 당업자는 조성물의 성분이 화학적

으로 불활성이도록 선택되어야 하고 본 발명의 세포의 생존력 또는 효능에 영향을 미치지 않을 것이며 인간과 같은 대상체에 투여하기에 적합할 것임을 인지할 것이다. 당업자는 본 발명의 방법에서 투여될 조성물 내의 세포 및 선택적 첨가제, 비히클 및/또는 담체의 양을 쉽게 결정할 수 있다.

- [0246] 본 발명의 조성물은 임의의 생리학적으로 허용되는 비히클로 투여될 수 있다. 투여를 위한 적합한 용량은 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0247] 본 발명의 세포를 포함하는 세포 집단은 정제된 세포 집단을 포함할 수 있다. 당업자는 본 명세서에 기재된 바와 같이 다양한 잘 알려진 방법을 사용하여 세포 집단에서 세포의 백분율을 쉽게 결정할 수 있다. 본 발명의 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 세포 집단의 순도 범위는 약 25% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 약 65% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 75%, 약 75% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 85%; 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 또는 약 95 내지 약 100%일 수 있다. 그러한 집단은 본 명세서에 개시된 바와 같이 본 발명의 방법으로 효율적으로 생성될 수 있거나, 본 명세서에 개시된 바와 같이 Dsg2 결합 분자를 발현하는 유전적으로 변형된 세포에 대해 선택적으로 농축될 수 있는 것으로 이해된다. 한 구현예에서 Dsg2 결합 분자는 CAR을 포함한다.
- [0248] 화합물은 매일 수 회와 같이 빈번하게 동물에게 투여될 수 있거나, 또는 덜 빈번하게, 예컨대 1일 1회, 1주 1회, 2주마다 1회, 매월 1회, 또는 심지어 덜 빈번하게, 예컨대 몇 개월마다 1회 또는 심지어 1년 1회로 투여될 수 있다. 용량의 빈도는 당업자에게 쉽게 명백할 것이며 치료되는 질환의 유형 및 중증도, 동물의 유형 및 연령 등과 같은(이에 국한되지 않음) 임의의 수의 요인에 따라 달라질 것이다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물의 제형은 약리학 분야에서 공지되거나 이후 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 준비 방법에는 활성 성분을 담체 또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 결합시킨 다음, 필요하거나 원하는 경우 생성물을 원하는 단일 또는 다중 용량 단위로 성형하거나 포장하는 단계가 포함된다.
- [0249] 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물의 설명은 주로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 약제학적 조성물에 관한 것이지만, 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에 투여하기에 적합하다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 다양한 동물에 대한 투여에 적합한 조성물을 만들기 위해 인간에 대한 투여에 적합한 약제학적 조성물의 변형은 잘 이해되고, 보통의 숙련된 수의과 약리학자는 그러한 변형을 만약 있다면 단지 일상적인 실험으로 설계하고 수행할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상체에는 인간 및 기타 영장류, 상업적으로 관련된 포유류, 예컨대 비인간 영장류, 소, 돼지, 말, 양, 고양이 및 개를 비롯한 포유류가 포함되나 이에 국한되지는 않는다.
- [0250] 본 발명의 방법에 유용한 약제학적 조성물은 안과용, 경구, 직장, 질, 비경구, 국부, 폐, 비강내, 협측, 또는 또 다른 투여 경로에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 다른 고려되는 제형은 투여된 나노입자, 리포솜 제제, 활성 성분을 함유하는 재밀봉된 적혈구, 및 면역학적 기반 제형을 함유한다.
- [0251] 본 발명의 약제학적 조성물은 단일 단위 용량으로, 또는 복수의 단위 용량으로 대량으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "단위 용량"은 활성 성분의 미리 결정된 양을 포함하는 약제학적 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 활성 성분의 투여량 또는 이러한 투여량의 편리한 분획, 예를 들어 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 동일하다.
- [0252] 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 및 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 동일성, 크기 및 상태에 따라 그리고 추가로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0253] 활성 성분 외에, 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가의 약제학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 섬유증 치료에 유용한 다른 활성제는 코르티코스테로이드를 포함하는 항염증제 및 면역억제제를 포함한다.
- [0254] 본 발명의 약제학적 조성물의 제어 또는 지속 방출 제형은 종래의 기술을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0255] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 약제학적 조성물의 "비경구 투여"는 대상체의 조직의 물리적 파괴 및 조직의 파괴를 통한 약제학적 조성물의 투여를 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함한다. 따라서 비경구 투여는 조성물의 주사, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직 침투 비외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 약제학적 조성물의 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 안구내, 유리체내, 피하, 복강내, 근육내, 흉골내 주사, 종양내 및 신장 투석 주입 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는 것으로 고려된다.
- [0256] 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물의 제형은 멸균수 또는 멸균 등장 식염수와 같은 약제학적으로 허용 가능

한 담체와 조합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 볼러스 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사 가능한 제형은 앰플 또는 보존제를 함유하는 다중 용량 용기와 같은 단위 투여 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 중의 에멀전, 페이스트, 및 이식가능한 지속 방출 또는 생분해성 제형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 제형은 현탁제, 안정화제 또는 분산제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제형의 일 구현예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적합한 비히클(예를 들어, 무발열원 멸균수)로 재구성하기 위한 건조(즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다.

[0257] 약제학적 조성물은 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이러한 현탁액 또는 용액은 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있고, 활성 성분 이외에 추가 성분, 예컨대 분산제, 습윤제 또는 현탁제를 포함할 수 있다. 이러한 멸균 주사 가능한 제형은 예를 들어 물 또는 1,3-부탄 디올과 같은 무독성의 비경구적으로 허용 가능한 희석제 또는 용매를 사용하여 제조될 수 있다. 기타 허용 가능한 희석제 및 용매에는 링거 용액, 등장성 염화나트륨 용액 및 합성 모노- 또는 디-글리세리드와 같은 고정 오일이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 유용한 다른 비경구 투여 가능한 제형은 활성 성분을 미세결정성 형태로, 리포솜 제제로, 또는 생분해성 중합체 시스템의 성분으로 포함하는 것을 포함한다. 서방성 또는 이식용 조성물은 에멀전, 이온 교환 수지, 난용성 중합체 또는 난용성 염과 같은 약제학적으로 허용 가능한 중합체성 또는 소수성 물질을 포함할 수 있다.

[0258] 본 발명의 약제학적 조성물은 구강을 통한 폐 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하고 약 0.5 내지 약 7 나노미터, 또는 약 1 내지 약 6 나노미터 범위의 직경을 갖는 건조 입자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 편리하게는 추진제의 스트림이 분말을 분산시키도록 유도될 수 있는 건조 분말 저장소를 함유하는 장치를 사용하거나, 또는 자가-추진 용매/분말-분배 용기, 예컨대 밀봉된 용기에서 저비점 추진제 중에 용해 또는 현탁된 활성 성분을 함유하는 장치를 사용하여 투여하기 위한 건조 분말의 형태이다. 일 구현예에서, 이러한 분말은 중량 기준으로 입자의 적어도 98%가 0.5 나노미터 초과 직경을 갖고 개수 기준으로 입자의 적어도 95%가 7 나노미터 미만의 직경을 갖는 입자를 포함한다. 일 구현예에서, 중량 기준으로 입자의 적어도 95%는 1 나노미터 초과 직경을 갖고 개수 기준으로 입자의 적어도 90%는 6 나노미터 미만의 직경을 갖는다. 일부 예에서, 건조 분말 조성물은 당과 같은 고체 미세 분말 희석제를 포함하고 편리하게 단위 용량 형태로 제공된다.

[0259] 저비점 추진제는 일반적으로 대기압에서 비등점이 65° F 미만인 액체 추진제를 포함한다. 일반적으로, 추진제는 조성물의 50 내지 99.9%(w/w)를 구성할 수 있고, 활성 성분은 조성물의 0.1 내지 20%(w/w)를 구성할 수 있다. 추진제는 액체 비이온성 또는 고체 음이온성 계면활성제 또는 고체 희석제(일부 예에서 활성 성분을 포함하는 입자와 동일한 차수의 입자 크기를 가짐)와 같은 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0260] 폐 전달용으로 제형화된 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 용액 또는 현탁액의 액적 형태로 활성 성분을 제공할 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하는 수성 또는 희석 알코올성 용액 또는 현탁액(선택적으로 멸균)으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있고, 임의의 분무 또는 분무 장치를 사용하여 편리하게 투여될 수 있다. 이러한 제형은 폼미제 예컨대 사카린 나트륨, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제, 또는 보존제 예컨대 메틸하이드록시벤조에이트를 포함하지만 이에 국한되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 투여 경로에 의해 제공된 액적은 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위의 평균 직경을 갖는다.

[0261] 폐 전달에 유용한 것으로 본 명세서에 기재된 제형은 또한 본 발명의 약제학적 조성물의 비강내 전달에 유용하다.

[0262] 비강내 투여에 적합한 또 다른 제형은 활성 성분을 포함하고 약 0.2 내지 500 마이크로미터의 평균 입자를 갖는 조립 분말이다. 이러한 제형은 스프너(snuff)를 취하는 방식, 즉 콧구멍 가까이에 고정된 분말 용기로부터 비강을 통해 빠르게 흡입함으로써 투여된다.

[0263] 비강 투여에 적합한 제형은 예를 들어 약 0.1%(w/w)만큼 적게 및 100%(w/w)만큼 많은 활성 성분을 포함할 수 있고, 본 명세서에 기재된 추가 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0264] 본 발명의 약제학적 조성물은 협측 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이러한 제형은 예를 들어, 통상적인 방법을 사용하여 제조된 정제 또는 로젠지의 형태일 수 있고, 예를 들어 0.1 내지 20%(w/w) 활성 성분일 수 있으며, 밸런스는 경구로 용해성 또는 분해성 조성물 및, 선택적으로, 본 명세서에 기재된 추가 성분 중 하나 이상을 포함한다. 대안적으로, 협측 투여에 적합한 제형은 활성 성분을 포함하는 분말 또는 에어

로졸화 또는 분무화된 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 분말화, 에어로졸화 또는 에어로졸화 제형은 분산될 때 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위의 평균 입자 또는 액적 크기를 가지며, 본 명세서에 기재된 추가 성분 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다.

[0265] 본 명세서에 사용된 "추가 성분"은 하기 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: 부형제; 표면 활성제; 분산제; 불활성 희석제; 과립화 및 봉해제; 결합제; 윤활제; 감미제; 풍미제; 착색제; 보존제; 생리적으로 분해성 조성물 예컨대 젤라틴; 수성 비히클 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 현탁화제; 분산제 또는 습윤제; 유화제, 진통제; 완충액; 염; 증점제; 충전제; 유화제; 항산화제; 항생제; 항진균제; 안정화제; 및 약제학적으로 허용 가능한 중합체성 또는 소수성 물질. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 다른 "추가 성분"은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 본 명세서에 참조로 포함되어 있는 Remington's Pharmaceutical Sciences(1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA)에 기재되어 있다.

[0266] 키트

[0267] 본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 일 구현예에서, 키트는 하나 이상의 용기에 본 발명의 유전자 조작된 면역 세포를 생성하기 위한 하나 이상의 벡터를 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 CAR을 포함한다. 일 구현예에서, 키트는 대상체로부터 유래된 자가 세포 또는 적합성 대상체에게 투여될 비-자가 세포로부터 유전자 조작된 면역 세포를 생성하는 데 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 키트는 대상체에 대한 자가 또는 비-자가 투여를 위한 본 발명의 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 용기에 본 발명의 면역 세포를 포함한다.

[0268] 암 요법

[0269] 본 발명의 조성물은 인간 및 동물의 암을 예방, 약화, 최소화, 제어 및/또는 경감시키는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 원발성 종양 성장 속도를 늦추는데 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 때 암세포의 확산을 멈추기 위해 사용될 수 있다. 이와 같이, 유효량의 본 발명의 Dsg2 결합 분자, 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자, 또는 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 발현하도록 변형된 세포는 하나 이상의 약물 또는 기타 약제와의 병용 요법의 일부로서 투여될 수 있다. 병용 요법의 일부로 사용될 때, 본 발명의 조성물에 의해 제공되는 전이 감소 및 원발성 종양 성장 감소는 환자를 치료하기 위해 사용되는 임의의 약제 또는 약물 요법의 보다 효과적이고 효율적인 사용을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 조성물에 의한 전이의 제어는 대상체에게 질환을 한 위치에 집중시키는 더 큰 능력을 제공한다.

[0270] 일 구현예에서, 본 발명은 암에 대한 보완 요법, 예컨대 수술, 화학요법, 화학요법제, 방사선 요법, 또는 호르몬 요법 또는 그의 조합으로 본 발명의 조성물로 치료하기 전에, 동시에 또는 그 후에 대상체를 치료하는 것을 포함하는, 암 전이를 치료하는 방법을 제공한다.

[0271] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 Dsg2 결합 분자, 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자, 또는 본 발명의 Dsg2 결합 분자를 발현하도록 변형된 세포 및 하나 이상의 추가의 치료제의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 펩티드, 핵산 분자, 소분자, 항체 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 암 치료를 위한 것이다.

[0272] 일 구현예에서, 치료제는 체크포인트 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원과 면역 체크포인트 항체의 조합은 항원만을 포함하는 면역원성 조성물보다 더 효율적으로 면역계를 유도한다. 이러한 보다 효율적인 면역 반응은 암의 치료 및/또는 예방에 있어 증가된 효능을 제공한다. 일 구현예에서, 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT 및 CEACAM1 중 적어도 하나를 억제한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 예시적인 체크포인트 억제제는 이필리무맙, 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피달리주맙, 아테졸리주맙, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 및 MK-3475를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0273] 일 구현예에서, 추가 치료제는 치료적 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 치료적 항체 또는 항체 단편은 종양 세포에 결합하거나, 종양 세포의 사멸을 유도하거나, 종양 세포 증식 또는 전이를 방지하는 당업계에 공지된 임의의 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 치료제는 항체-약물 접합체를 포함한다.

[0274] 일 구현예에서, 본 발명은 암에 대한 보완 요법, 예컨대 수술, 화학요법, 화학요법제, 방사선 요법, 또는 호르몬 요법 또는 그의 조합으로 본 발명의 조성물로 치료하기 전에, 동시에 또는 그 후에 대상체를 치료하는 것을 포함하는, 암 전이를 치료하는 방법을 제공한다.

[0275] 화학요법제는 세포독성제(예를 들어, 5-플루오로우라실, 시스플라틴, 카보플라틴, 메토틱세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 옥소루비신, 카무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 사이타라빈 USP, 사이클로포스파미드, 에스트라미신 포스페이트 나트륨, 알트레타민, 하이드록시우레아, 이포스파미드, 프로카바진, 미토마이신, 부설판, 사이클로포스파미드, 미톡산트론, 카보플라틴, 시스플라틴, 인터페론 알파-2a 재조합체, 파클리탁셀, 테니포시드, 및 스트렙토조시), 세포독성 알킬화제(예를 들어, 부설판, 클로르암부실, 사이클로포스파미드, 멜팔란, 또는 에틸설포산), 알킬화제(예를 들어, 아살레이, AZQ, BCNU, 부설판, 비설판, 카복시프탈라토플라티넘, CBDCA, CCNU, CHIP, 클로르암부실, 클로로조토신, 시스-플라티넘, 클로메손, 시아노모폴리노독소루비신, 사이클로디손, 사이클로포스파미드, di안하이드로갈락티톨, 플루오로도판, 헵셀팜, 하이칸톤, 이포스파미드, 멜팔란, 메틸 CCNU, 미토마이신 C, 미토졸아미드, 질소 머스타드, PCNU, 피페라진, 피페라진디온, 피포브로만, 포르피로마이신, 스피로히단토인 머스타드, 스트렙토조토신, 테록시론, 테트라플라틴, 티오테파, 트리에틸렌멜라민, 우라실 질소 머스타드, 및 Yoshi-864), 세포분열저지성 제제(예를 들어, 알로콜치신, 할리콘드린 M, 콜히친, 콜히친 유도체, 둘라스타틴 10, 메이탄신, 라이족신, 파클리탁셀 유도체, 파클리탁셀, 티오텔리친, 트리틸 시스테인, 빈블라스틴 설페이트, 및 빈크리스틴 설페이트), 식물성 알칼로이드(예를 들어, 악티노마이신 D, 블레오마이신, L-아스파라기나제, 이다루비신, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 미트라마이신, 미토마이신, 다우노루비신, VP-16-213, VM-26, 나벨빈 및 탁소테르), 생물제제(예를 들어, 알파 인터페론, BCG, G-CSF, GM-CSF, 및 인터류킨-2), 토포이성화효소 I 억제제(예를 들어, 캄프토테신, 캄프토테신 유도체, 및 모폴리노독소루비신), 토포이성화효소 II 억제제(예를 들어, 미톡산트론, 아모나파이드, m-AMSA, 안트라피라졸 유도체, 피라졸로아크리딘, 비스안트렌 HCL, 다우노루비신, 데옥시독소루비신, 메노가릴, N,N-디벤질 다우노마이신, 옥산트라졸, 루비다존, VM-26 및 VP-16), 및 합성물(예를 들어, 하이드록시우레아, 프로카바진, o,p'-DDD, 다카바진, CCNU, BCNU, 시스-디아민디클로로플라티넘, 미톡산트론, CBDCA, 레바미솔, 헥사메틸멜라민, 올-트랜스 레틴산, 글리아텔 및 포르피머 나트륨)을 포함한다.

[0276] 항증식제는 세포의 증식을 감소시키는 화합물이다. 항증식제는 알킬화제, 항대사물질, 효소, 생물학적 반응 조절제, 여러 종류 제제, 호르몬 및 길항제, 안드로겐 억제제(예를 들어, 플루타미드 및 류프롤라이드 아세테이트), 항에스트로겐(예를 들어, 타목시펜 시트레이트 및 이의 유사체, 토레미펜, 드롤록시펜 및 볼록시펜)을 포함하고, 특정 항증식제의 추가 예는 레바미솔, 갈륨 니트레이트, 그라니세트론, 사르그라모스틴 스트론튬-89 클로라이드, 필그라스틴, 필로카르핀, 텍스라족산, 및 온단세트론을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0277] 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 세포독성제/항신생물제 및 항혈관형성제를 포함하는 다른 항종양제와 함께 투여될 수 있다. 세포독성제/항신생물제는 암세포를 공격하고 죽이는 제제로 정의된다. 일부 세포독성제/항신생물제는 종양 세포의 유전 물질을 알킬화하는 알킬화제이고, 그 예는 시스-플라틴, 사이클로포스파미드, 질소 머스타드, 트리메틸렌 티오포스포르아미드, 카무스틴, 부설판, 클로르암부실, 벨루스틴, 우라실 머스타드, 클로마파진, 및 다카바진이다. 다른 세포독성/항신생물제는 종양 세포에 대한 항대사물질, 예를 들어 시토신 아라비노시드, 플루오로우라실, 메토틱세이트, 머캅토포린, 아지티오프람, 및 프로카바진이다. 다른 세포독성/항신생물제는 항생제, 예를 들어, 독소루비신, 블레오마이신, 악티노마이신, 다우노루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 마이토마이신 C, 및 다우노마이신이다. 이들 화합물에 대해 시판되는 수많은 리포솜 제형이 있다. 또 다른 세포독성제/항신생물제는 유사분열 억제제(빈카 알칼로이드)이다. 여기에는 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 에토포시드가 포함된다. 여러 종류 세포독성/항신생물제는 탁솔 및 그것의 유도체, L-아스파라기나제, 항종양 항체, 다카바진, 아자시티딘, 암사크린, 멜팔란, VM-26, 이포스파미드, 미톡산트론, 및 빈테신을 포함한다.

[0278] 항혈관형성제는 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 항혈관형성제는 인간화 및 키메라 항체를 포함하는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 압타머 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 혈관신생의 다른 공지된 억제제는 안지오스타틴, 엔도스타틴, 인터페론, 인터류킨 1(알파 및 베타 포함) 인터류킨 12, 레틴산, 및 메탈로프로테이나제-1 및 -2의 조직 억제제(TIMP-1 및 -2)를 포함한다. 항-혈관신생 활성을 갖는 토포이소머라제 II 억제제인 라조산과 같은 토포이성화효소를 포함하는 소분자도 사용될 수 있다.

[0279] 본 발명의 조성물과 함께 사용될 수 있는 다른 항암제는 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스테이트; 벤조테파; 바이칼루타미드; 비스안트렌 하이드로클로라이드; 바이스나파이드 디메실레이트; 바이젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부설판; 각티노마이신; 칼루스테론; 카라세마이드; 카르베티머; 카보플라틴; 카무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀롤; 클로르암부실; 사이클레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이

트; 사이클로포스파미드; 사이타라빈; 다카바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르파플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 데다트렉세이트; 에플로니틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르블로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 쟈시타빈; 쟈시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 인터류킨 II(재조합체 인터류킨 II, 또는 rIL2 포함), 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-I a; 인터페론 감마-I b; 이프로플라틴; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로소크산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로르에타민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 머캅도퓨린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미톡산트론 하이드로클로라이드; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가스; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 페르포스파미드; 피포브로만; 피포셀판; 파이록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진 하이드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 하이드로클로라이드; 피라조퓨린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 설로페누르; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스트라톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조퓨린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투블로졸 하이드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레데파; 바르레오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈류로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈졸리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 하이드로클로라이드를 포함한다. 다른 항암 약물은 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 20-에피-1,25 디하이드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실플벤; 아데사이펜올; 아도젤레신; 알테스류킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레벨린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐라이드; 아나스트로졸; 안드로그라폴라이드; 혈관신생 억제제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-등축화 골 형태형성 단백질-1; 안티안드로젠, 전립선 암종; 항에스트로젠; 안티네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 아파이디콜린 글리시네이트; 세포자멸 유전자 조절제; 세포자멸 조절제; 아퓨린산; ara-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 탈아미노효소; 아실라크라인; 아타메스탄; 아트리무스틴; 약시나스타틴 1; 약시나스타틴 2; 약시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 박카틴 III 유도체; 발라놀; 바티마스테이트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베틀린산; bFGF 억제제; 바이칼루타미드; 비스안트렌; 비스아지리디닐스페르민; 바이스나파이드; 비스트라텐 A; 바이젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티테인; 부티오닌 설포시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄포토텐신 유도체; 카나리폭스 IL-2; 카페시타빈; 카복사미드-아미노-트리아졸; 카복시아미도트리아졸; 카레스트 M3; CARN 700; 연골 유래된 억제제; 카르젤레신; 카세인 키나제 억제제(ICOS); 카스타노스페린; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로린; 클로로퀴놀살린 설포아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로마이펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베시딘 816; 크리스나톨; 크립토파이신 8; 크립토파이신 A 유도체; 큐라신 A; 사이클로펜트안트라퀴논; 사이클로플라탐; 사이페마이신; 사이타라빈 옥포스페이트; 세포용해 인자; 사이토스타틴; 다클릭시맙; 데시타빈; 데하이드로디텐닌 B; 데슬로렐린; 텍사메타손; 텍시포스파미드; 텍스라죽산; 텍스베라파밀; 디아지쿠온; 디텐닌 B; 디독스; 디에틸노르스페르민; 디하이드로-5-아자시타딘; 디하이드로탁솔, 9-; 디옥사마이신; 디페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 둘라세트론; 독시플루리딘; 드롤록시펜; 드로나비놀; 듀오카르마이신 SA; 엠셀렌; 예코무스틴; 예델포신; 에드레콜로맘; 에플로니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테라이드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로젠 효능제; 에스트로젠 길항제; 에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티나이드; 필그라스티م; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레즈엘라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈; 플루오로다우노루비신 하이드로클로라이드; 포르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사파이린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스;

젤라티나제 억제제; 젤시타빈; 글루타티온 억제제; 헵살팜; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비스아세트아미드; 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이미다조아크리도네스; 이미퀴모드; 면역증대 펩티드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 효능제; 인터페론; 인터류킨; 아이오벤구안; 요오드독소루비신; 아이포메아놀, 4-; 아이로플라트; 아이르소글라딘; 아이소벤가졸; 아이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀라이드; 카할라리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스탐; 렌티난 설페이트; 랩톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤라이드+에스트로겐+프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친유성 이당류 펩티드; 친유성 백금 화합물; 리소클린아미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로소크산트론; 로바스타틴; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사파이린; 라이소필린; 분해적 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴라이신 억제제; 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오니나제; 메토클로프라마이드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스탐; 불인치된 이중 가닥 RNA; 미토구아존; 미토라톨; 미토마이신 유사체; 미토나파이드; 미토크신 섬유아세포 성장 인자-사포린; 미톡산트론; 모파로텐; 몰그라모스탐; 단클론성 항체, 인간 용모성 성선자극호르몬; 모노포스포릴 지질 A4 미오박테리아 세포벽 sk; 모피다물; 다중 약물 내성 유전자 억제제; 다중 종양 억제인자 1 기반 요법; 머스타드 항암제; 마이카퍼옥사이드 B; 마이코박테리아 세포 벽 추출물; 마이리아포론; N-아세틸디달린; N-치환된 벤즈아미드; 나파렐린; 나그레스트립; 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스탐; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 중성 엔도펩티다제; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절제; 산화질소 산화방지제; 니트룰린; O6-벤질구아닌; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드; 오나프리스톤; 온단세트론; 온단세트론; 올라신; 경구 사이토카인 유도물질; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴; 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도체; 팔라우아민; 팔미토일라이족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가스; 펠데신; 펜토산 폴리설페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 페르포스파미드; 페릴릴 알코올; 펜아지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카르핀 하이드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노겐 활성화제 억제제; 백금 착체; 백금 화합물; 백금-트리아민 complex; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 bis-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 억제제; 단백질 A 기반 면역 조절제; 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 키나제 C 억제제, 미세조류1; 단백질 티로신 포스파타제 억제제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; 퓨르퓨린스; 피라졸로아크리딘; 피리독살화된 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 콘주게이트; raf 길항제; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 레틸펩틴 탈메틸화됨; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 라이족신; 리보자임; RII 레틴아미드; 로글레티미드; 로히투카인; 로무르타이드; 로퀴니벡스; 부비기논 BI; 루복실; 사핀골; 사인토펜; 사르쿠누; 사르코파이톨 A; 사르그라모스탐; Sdi 1 모방체; 세무스틴; 노화 유래된 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오티드; 신호 전달 억제제; 신호 전달 조절제; 단쇄 항원 결합 단백질; 시조푸란; 소부족산; 나트륨 보로캡테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스포지스타틴 1; 스퀴알라민; 줄기 세포 억제제; 줄기세포 분열 억제제; 스티피아미드; 스트로멜라이신 억제제; 설피노신; 초활성 혈관활성 장관 펩티드 길항제; 수리다스타; 수라민; 스와인소닌; 합성 글리코사미노글리칸; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 억제제; 테모포르핀; 테모졸로미드; 테니포시드; 테트라클로로데카옥사이드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모방체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 효능제; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주식 에틸 에티오프루린; 티라파자민; 티타노센 바이클로라이드; 탐센틴; 토레미펜; 전분화능 줄기 세포 인자; 번역 억제제; 트레티노인; 트리아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토텐린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 티로신 키나제 억제제; 타이르포스틴; UBC 억제제; 우베니멕스; 비노생식동 유래된 성장 억제 인자; 유로키나제 수용체 길항제; 바프레오티드; 바리올린 B; 벡터 시스템, 적혈구 유전자 요법; 벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈크살틴; 비탁신; 보로졸; 조노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 지노스타틴 스티말라머. 일 구현예에서, 항암 약물은 5-플루오로우라실, 탁솔 또는 류코보린이다.

[0280] 실험예

[0281] 본 발명은 하기 실험예를 참조하여 더욱 상세하게 기재된다. 이러한 실시예는 설명의 목적으로만 제공되며 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 의도가 아니다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0282] 추가 설명 없이, 당업자는 선행 기술 및 하기 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 활용하

고 청구된 방법을 실시할 수 있다고 여겨진다. 다음 작업 예는 본 개시내용의 나머지 부분을 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

- [0283] 실시예 1: 고행암에 대한 Dsg2 지정 CAR-T 세포 요법
- [0284] 테스모솜 카드헤린, 테스모글레인 2(Dsg2)는 다양한 세포 집단에서 세포 증식 및 이동에 관여된 신호전달 경로의 중요한 조절자이다(Kant 등 2015; Eshkind 등, 2002, Eur J Cell Biol. 81: 592-598). 또한, Dsg2는 거의 모든 고행암에서 상향조절되고 발현은 불량한 예후와 상관관계가 있고(Kamekura 등, 2013, Oncogene. 33(36): 4531-4536; Brennan, Hu 등, 2007, J Cell Sci. 120(5): 758-771, Brennan-Crispi 등, 2015, Oncotarget. 6(11): 6(11):8593-8605, Brennan-Crispi 등, 2019, J Invest Dermatol. 139(2): 300-307; Tan 등 2016, Oncotarget. 7(29): 46492-46508), 이는 표적 요법을 위한 새로운 후보가 되었다. 많은 조직에서 Dsg2의 발현과 다양한 조직에서의 중요한 역할은 자가면역 독성의 높은 위험을 반영하는 실행 가능한 면역요법 표적이 아닐 것임을 시사한다. 그러나 이론에 얽매이지 않고, 암에 의한 Dsg2 과발현 및 조절 장애와 정상 세포의 테스모솜에서 Dsg2의 격리의 맥락에서, 정상 조직에서 부수적인 독성 없이 Dsg2 표적화 CAR-T 또는 CAR-NK 세포 요법으로 특정 암세포 제거를 위한 "기회 창"이 존재하는 가설을 제기하였다. 실제로, 본 명세서에 제시된 데이터는 거의 모든 고행 암 유형이 마우스 모델에서 독성 없이 Dsg2 CAR-T 세포에 의해 표적화되고 제거될 수 있음을 시사하며, 이는 Dsg2 표적화 CAR-T/CAR-NK 세포 요법이 암에 대한 잠재적으로 보편적인 "기성품" 세포 요법임을 입증하였다.
- [0285] 이 작업은 다양한 줄기 세포 집단에서 세포 증식 및 이동에 관여된 신호전달 경로의 중요한 조절자인 카드헤린 테스모글레인 2(Dsg2)에 초점을 맞추었다. Dsg2는 13개의 가장 일반적인 암 중 10개에서 상향조절되며 그 발현은 불량한 예후와 관련이 있어 Dsg2를 인간 암의 스펙트럼에서 표적 치료를 위한 새로운 후보로 만든다.
- [0286] 인간 SCC 이종이식편이 Dsg2 특이적 단클론성 항체 치료에 의해 표적화될 수 있다는 것이 입증되었다. 이 작업은 Dsg2의 비정상적인 세포 표면 제시가 CAR-T 세포 면역요법을 위한 기회적 치료 표적을 제공한다는 것을 입증한다. Dsg2 특이적 하이브리도마는 huma Dsg2 특이적 항체 서열을 얻고 huma Dsg2 특이적 CAR 및 CAR-T 세포를 생성하는 데 사용된다. 본 명세서에 제시된 작업은 시험관 내에서 cSCC 및 HNSCC 세포를 죽이고 생체 내에서 환자의 종양 이종이식편을 폐기하는 효과를 입증한다.
- [0287] 테스모솜은 피부 및 심장과 같은 기계적 스트레스를 경험하는 조직에서 풍부하게 발현되는 접착 접합부이다(Kowalczyk 및 Green, 2013, Prog Mol Biol Transl Sci. 116: 95-118). 이들은 중간 세포골격 케라틴 필라멘트에 막형단 접착 성분을 연결하여 인장 강도를 제공한다. 카드헤린의 세포외 도메인(테스모글레인 및 테스모롤린)은 세포-세포 접착을 매개하는 반면 세포내 세포질 도메인은 아르마딜로(플라코글로빈 및 플라코필린) 신호전달 단백질에 결합하고 링커 단백질의 플라킨(테스모플라킨 및 페리플라킨) 패밀리를 동원한다. 인간에서, 테스모솜 기능의 파괴는 피부, 손발톱, 모발 및 심장을 포함한 다양한 조직에 영향을 미치는 여러 자가면역, 감염 및 유전 장애의 근간을 이룬다(Najor, 2018, Annu Rev Pathol. 13: 51-70). 4개의 뚜렷한 테스모글레인 유전자(Dsg 1-4)가 있으며 Dsg1, 3 및 4는 주로 피부 및 구강 점막과 같은 계층화 상피에 제한되는 반면 Dsg2는 단순 상피 및 심장에서도 발견된다. huma Dsg2 유전자의 돌연변이는 종종 돌연사를 초래하는 일부 부정맥 유발성 우심실 심근병증의 근간이 된다(Lombardi 및 Marian, 2010, Curr Opin Cardiol. 25: 222-228). Dsg2는 또한 호흡기 및 요로 감염에 관여하고 알츠하이머병과 관련된 아테노바이러스에 대한 수용체 역할을 한다(Wang, Li 등 2011, Nat Med. 17(1): 96-104). 흥미롭게도, 인간 다분화능 줄기 세포에서 Dsg2는 자가 재생, 배아체 및 기형종 형성에 중요한 것으로 나타났으며, β -카테닌/슬러그 경로를 통해 상피-간엽 전환을 매개한다(Park, Son 등, 2018, Stem Cell Reports. 11(1): 115-127). 마우스에서, Dsg2 유전자의 절제는 배반포에서 영양외배엽층의 손실 및 배아 치사를 초래하고 Dsg2^{-/-} 배아 줄기 세포는 배양에서 생존할 수 없으며 이는 Dsg2가 세포 성장과 생존에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다(Eshkind, Tian 등, 2002, Eur J Cell Biol. 81: 592-598).
- [0288] Dsg2는 악성 상피 세포주와 두 가지 가장 일반적인 피부암인 기저 세포 암종(BCC) 및 SCC에서 높게 발현된다(Biedermann, Vogelsang 등, 2005, J Pathol. 207(2): 199-206; Brennan 및 Mahoney, 2009, Cell Adh Migr. 3(2): 148-154) 또한, Dsg2는 맥관형성 모방을 촉진하여 종양 혈액 공급을 증가시키고 악성 흑색종에서 불량한 예후와 관련이 있다(Tan, Mintoff 등, 2016, Oncotarget. 7(29): 46492-46508). Dsg2의 과발현은 전립선암과 결장암에서도 발생하며, 이는 다양한 상피 유래 조직에서 종양형성에서 Dsg2의 역할을 암시한다(Barber, Castillo-Martin 등, 2014, PLoS One. 9(6): e98786). 결장 상피 암종 세포에서 Dsg2의 녹다운은 마우스에서 증식을 감소시키고 이종이식 종양 성장을 억제한다(Kamekura, Kolegraff 등, 2013, Oncogene. 33(36): 4531-

4536). 또한, 형질전환 마우스의 표피에서 Dsg2의 강제 발현은 표피 과다형성을 촉진하고 종양 발달에 대한 감수성을 증가시킨다(Brennan, Hu 등, 2007, J Cell Sci. 120(5): 758-771; Brennan, Peltonen 등, 2012, Oncogene. 31(13): 1636-1648; Overmiller, McGuinn 등, 2016, Oncotarget, 7(25): 37536-37555). Stat3를 통해, Dsg2는 Hh 신호전달 경로의 표적 유전자인 Gli1 및 Ptch1을 상향 조절하고, 화합물 Dsg2/Ptcl^{+lacZ} 마우스는 화학적 발암원에 대한 반응으로 BCC 및 SCC의 발달 및 종양 형성을 가속화하였다(Brennan-Crispi 등 2015, Oncotarget. 6(11): 6(11):8593-8605; Brennan-Crispi 등, 2019, J Invest Dermatol. 139(2): 300-307).

[0289] SCC에 의한 Dsg2 과발현 및 정상 세포의 테스모솜에서 Dsg2의 격리가 정상 조직에서 부수적인 독성 없이 Dsg2 특이적 CAR-T 세포 요법에 의해 SCC를 특이적으로 제거하기 위한 "기회 창"을 생성할 수 있는지 여부를 조사하였다(도 1).

[0290] Dsg2는 HNSCC에서 상향 조절된다.

[0291] Dsg2는 임의의 정상 구강 점막(n=12)에서 검출되지 않은 반면, 16개의 HNSCC 중 15개는 Dsg2에 대해 양성이었다(도 2a). 이것은 cSCC 조직 배열을 사용하여 얻은 이전 결과와 유사하다(Wahl 2002, Hybrid Hybridomics. 21(1): 37-44; Biedermann, Vogelsang 등, 2005, J Pathol. 207(2): 199-206; Brennan 및 Mahoney, 2009, Cell Adh Migr. 3(2): 148-154). 인실리코 분석은 HNSCC(proteinatlas.org)에서 Dsg2 발현과 불량한 전체 생존 확률을 연관시킨다(도 2b). 이러한 결과는 Dsg2가 고위험 cSCC 및 HNSCC에서 요법을 위한 우수한 표적이 될 수 있으며, 이 방법은 폐, 전립선 및 결장을 포함한 다른 높은 Dsg2 발현 암에 적용될 수 있음을 시사한다.

[0292] 종양 성장에서의 Dsg2

[0293] 종양 성장에서 Dsg2의 역할을 추가로 평가하기 위해, 외인성 GFP 또는 Dsg2/GFP를 안정적으로 발현하는 A431 cSCC 세포를 레트로바이러스 발현 벡터 LZRS-ms-neo를 사용하여 생성하였다(Brennan, Hu 등, 2007, J Cell Sci. 120(5): 758-771; Brennan, Peltonen 등, 2012, Oncogene. 31(13): 1636-1648; Overmiller, McGuinn 등 2016, Oncotarget. 7(25): 37536-37555). 세포(1X10⁶)를 면역손상된 SCID 마우스에 이식하고 이식 후 27일까지 종양 부피를 측정하였다. cSCC-GFP 종양은 평균 부피가 662 mm³에 도달한 반면, cSCC-Dsg2/GFP 라인은 실험 결과에서 1428 mm³의 훨씬 더 큰 부피를 달성하였다(도 3a). 이러한 결과는 Dsg2가 악성의 이종이식 모델에서 전 종양형성유발임을 입증한다. SCC 종양 이종이식 성장 및 진행에서 Dsg2를 추가로 평가하기 위해, Dsg2의 네 번째 세포의 도메인의 에피토프를 표적으로 하고 Dsg2 내재화를 촉진하는 mAb 6D8을 사용하였다(Biedermann, Vogelsang 등, 2005, J Pathol. 207(2): 199-206; Brennan 및 Mahoney, 2009, Cell Adh Migr. 3(2): 148-154). 정제된 mAb 6D8을 20일 동안 매주 2회(5mg/kg) 복강내 전달하였다. 처리된 마우스로부터 유래된 종양은 처리되지 않은 마우스(756 mm³)보다 상당히 작았다(133 mm³)(도 3b). mAb 10D2에서도 유사한 결과가 발견되었다(도 3c). Ki67+ 암 세포의 수를 분석한 결과, mAb 6D8 처리된 이종이식편은 이종이식편의 건강한 층에서 활발하게 분열하는 세포가 현저히 적었다. mAb 6D8 처리된 종양은 또한 PBS 처리된 종양보다 훨씬 적은 Dsg2, EGFR 및 c-Src를 발현하였다.

[0294] SCC 종양 발달을 억제하는 치료 수단으로서의 Dsg2

[0295] 이종이식편은 일차 인간 cSCC 세포를 사용하여 생성되었다. 종양의 면역염색은 높은 수준의 Dsg2를 보여주었다(도 4). 표적화된 mAb 요법은 일반적으로 암 세포사를 유도하고 성장하는 종양으로의 혈관신생을 방해하며 암세포의 성장을 억제한다. Dsg2 지정 mAb의 주요 관심사는 다양한 Dsg2 발현 장기에서 표적외 효과일 것이기 때문에, mAb 6D8 및 10D2 단독으로 최대 4주 동안 격일로 5 mg/kg(~100 µg)으로 장기간 처리한 마우스 코호트에서 다양한 조직의 mAb 결합 및 조직병리학을 평가하였다(Sewell, Chapman 등 2017, MAbs. 9: 742-755). 이 마우스는 PBS 처리된 대조군과 마찬가지로, 확장된 mAb 처리 후 결장, 심장, 피부 및 구강 점막의 조직 구조가 정상이었으며 항마우스 이차 Ab의 직접 적용은 이러한 조직에서 결합된 mAb 6D8 또는 10D2를 감지하지 못하였다. mAb 처리된 마우스 중 어느 것도 치료로 손실되지 않았으며 관찰 가능한 치료 관련 부작용도 없었다. 이는 Dsg2가 정상 세포의 테스모솜 복합체 내에 격리되어 Dsg2 mAb에 의한 결합 및 표적외 독성을 방지함을 시사한다. 이들 결과는 Dsg2 mAb 및 Dsg2 지정 CAR-T 세포와 같은 면역요법을 포함하는 SCC 치료를 위한 항-Dsg2 요법의 효능 및 내약성을 입증한다.

[0296] huma Dsg2에 특이적인 mAb 특성화

[0297] 도 3b의 데이터는 mAb 6D8이 cSCC A431을 사용하여 이종이식 종양 성장을 줄이는 데 매우 효과적임을 보여준다.

실험은 특히 이중이식 및 CAR-T 세포 전달을 허용하는 NOD.Cg-Rag1tm1Mom1I2rgtm1Wj1/SzJ(NRG) 마우스에서 UM-SCC1 이중이식 종양 폐기에 대한 mAb 6D8의 유효성을 입증하도록 설계되었다. 간단히 말해, 접종 1주일 후, 종양은 $\sim 40 \text{ mm}^3$ 에 도달하며, 이 시점에서 최대 4주 동안 격일로 i.p. 주사(각 mAb 5mg/kg)로 정제된 mAb 6D8 또는 무관한 mAb(IgG2b; Sigma)로 마우스를 처리하였다. IgG2b는 임의의 인간 단백질을 인식하지 못하며 아이소타입 대조군 역할을 한다. 대조군 종양은 약 600 mm^3 에 이른다. 종양은 버니어 캘리퍼스로 측정하고 종양 부피는(길이 x 너비)² x 0.5(mm³)로 점수화된다. 데이터는 각 치료 그룹에 대한 평균 종양 부피 \pm SE로 표현된다(각 그룹에 대해 n>5). 종양을 수확하고 EGFR과 같은 다른 종양원성 마커에 대하여 Dsg2의 발현에 대해 분석한다. 이러한 실험은 mAb 6D8을 사용하여 Dsg2를 표적화하는 실험성을 확립한다.

[0298] CAR의 생성

[0299] pLVX-IRES-ZsGreen1(Clontech) 렌티바이러스 벡터에서 BiP(GRP-78) 신호 펩티드, scFv, CD8 α 힌지 영역, CD28 막횡단 및 세포내 도메인, 및 4-1BB(CD137) 및 CD3 ζ 세포내 도메인을 함유하는 제3 세대 코돈 최적화 CAR을 사용한다(Magee 등 2016, Oncoimmunology 5: e1227897; Magee, Abraham 등 2018, Cancer Immunol Res. 6: 509-516). V_L 및 V_H 가변 영역은 퇴화 프라이머를 사용하는 RT-PCR에 의해 mAb 6D8 및 mAb 10D2 하이브리도마로부터 클로닝되고 중첩 확장 PCR에 의해 글리신-세린 링커(G₄S)₄와 연결된다(Kochenderfer 등, 2009, J Immunother. 32: 689-702; Magee 등 2016, Oncoimmunology 5: e1227897).

[0300] Dsg2 CAR-T 세포의 기능 테스트(시험관 내)

[0301] Dsg2 지정 6D8-28BBz CAR-T 세포에 의한 표적 인식, 사이토카인 생산 및 세포용해를 시험관 내에서 검사하였다(도 10 및 도 11). 6D8 CAR-T 세포는 hama Dsg2 자극 및 양성 대조군(항-His; PMA/Iono) 자극 후에 TNF α 및 IFN γ 를 생산했지만, 자극이 없는 경우에는 그렇지 않았다(도 10a). 더욱이, CRISPR-Cas9 매개 Dsg2-녹아웃 A431 세포가 아닌 Dsg2 발현 A431 SCC 세포는 사이토카인 생산을 유도하였고(도 10b), 6D8 CAR-T 세포에 의해 용해되었다(도 11). 대조군 CAR-T 세포는 세포의 존재 하에 사이토카인을 생산하지 않았고 A431 세포를 용해하지 않았다(도 11).

[0302] 세포주 유래 이중이식편(CDX)에서 Dsg2 CAR-T 세포의 테스트

[0303] 시험관 내에서 Dsg2 발현 A431 SCC 세포의 성공적이고 특이적인 인식 후(도 10 및 도 11), 루시페라제 발현 A431 종양이 NSG 마우스에서 피하로 확립되었다(도 12). 대조군 또는 6D8 CAR-T 세포는 종양이 평균 500 mm^3 인 12일에 투여되었다. 대조군 동물에서 종양이 빠르게 진행되어(도 12a 및 12b), 투여 10일 이내에 100% 사망률을 초래하는 반면(도 12c), 종양은 재발 없이 >80일 생존(도 12c)하는 거의 모든 6D8-28BBz CAR-T 세포 처리된 동물에서 제거되었다(도 12a 및 12b).

[0304] Dsg2 CAR-T 세포는 장기간 지속된다.

[0305] Dsg2 발현 A431 SCC 종양을 생체내에서 성공적으로 특이적으로 제거한 후(도 12), 생존 동물을 NSG 마우스에서 피하로 A431 또는 Dsg2-녹아웃 A431 암 세포로 재공격하였다(도 13). 재도전된 마우스는 A431 세포에 저항했지만, Dsg2-녹아웃 A431 세포에는 저항하지 않았다(도 13a). 더욱이, 이들 동물의 비장 및 골수는 중추 및 이펙터 기억 표현형이 혼합된 CAR-T 세포(GFP+ 세포; 도 13b)를 함유하였다(도 13c).

[0306] 10D2 CAR-T 세포

[0307] 6D8 CAR-T 세포 외에, 10D2 CAR-T 세포를 생산하여 활성을 탐구하였다. 10D2 CAR-T 세포는 Dsg2 인식 시 IFN γ 및 TNF α 를 생성하고 Dsg2 발현 A431 SCC 세포를 용해하지만, 용해는 6D8 CAR-T 세포보다 적다(도 14a).

[0308] 10D2 CAR-T 세포 안전성

[0309] huma Dsg2만 인식하는 6D8 mAb(및 CAR-T)와 달리, 10D2 mAb는 인간 및 뮤린 Dsg2를 인식하므로(Brennan 및 Mahoney, 2009, Cell Adh Migr. 3(2): 148-154; Gupta 등 2015, Plos One, 10(3):e0120091), 이는 기존 마우스에서 안전성 평가가 가능하다. 10D2 CAR-T 세포는 A431 SCC 세포를 성공적으로 용해하지만(도 14a), 마우스에서 독성을 생성하지 않는다(도 14b). 10⁷ CAR-T 세포를 투여받은 동물은 CAR-T 세포 요법이 환자(Hay 등, 2017, Blood, 130:2295-2306; Morgan 등, 2010, Mol Ther, 18:843-851)와 마우스(3-4일에 체중 20% 감소)(Yang 등 2019, Journal for immunotherapy of cancer, 7:171)에서 심각한 독성과 사망을 일으키는 기간인 ~2주 이내에

독성을 나타내지 않는다(도 14b).

[0310] 인간 Dsg2 형질전환 마우스에서 10D2 및 6D8 CAR-T 세포 안전성

[0311] 인간 Dsg2 유전자좌의 BAC로부터 생산된 인간 Dsg2 형질전환 마우스(hDsg2^{Tg})를 University of Washington으로부터 획득하였다. 이들 마우스는 인간과 유사한 조직 및 세포 분포를 갖는 hDsg2를 생성하고(도 14c), hDsg2 연구를 위한 우수한 모델이다(Wang 등, 2012, J Virol, 86(11):6286-6302). 중요한 것은 이 마우스의 피부는 CAR-T 세포가 인식할 수 있는 강력한 Dsg2 발현을 가지고 있다는 것이다. 야생형이 아닌 hDsg2^{Tg} 마우스로부터 단일 세포 현탁액으로 단리된 각질형성세포는 생체외에서 성공적으로 6D8 CAR-T 세포 사이토카인 분비를 자극하였다(도 14d). 대조군, 6D8 또는 10D2 CAR-T 세포를 hDsg2^{Tg} 마우스에 투여하였다(10⁷ CAR-T 세포). 피부(도 14d)를 포함하는 조직(도 14c)에서 hDsg2의 발현에도 불구하고, 동물은 체중(도 14e) 및 조직학, CAR-T 세포 요법이 환자(Hay 등, 2017, Blood, 130:2295-2306; Morgan 등, 2010, Mol Ther, 18:843-851) 및 마우스(Castellarin 등, 2020, CI Insight, 5:e136012; Qin 등, 2020, Oncoimmunology, 9(1):1806009)에서 심각한 독성 및 사망을 초래한 기간에 의해 관찰한 4주 동안 독성을 나타내지 않았다.

[0312] 다른 암에 대한 Dsg2 지정 CAR-T 세포 요법

[0313] 이펙터 사이토카인 생산(도 15a) 및 사멸(도 15b)을 초래하는 6D8 CAR-T 세포에 의한 수많은 다른 암 세포의 인식을 검사하였다. 테스트한 모든 암 세포주는 성공적으로 6D8 CAR-T 세포를 활성화시켰고 세포에 의해 죽었다. 더욱이, 종양 성장 17일째에 투여된 6D8 CAR-T 세포는 DLD-1 결장직장암 이종이식편을 갖는 마우스를 성공적으로 치료하였다(도 16).

[0314] 실시예 2: Dsg2-CAR

[0315] 고형 종양 악성종양은 총체적으로 암 관련 사망의 주요 원인으로 남아 있다. 그러나 입양 세포 요법은 현재의 장애물을 직접 해결할 수 있는 면역-종양학 레퍼토리 내에서 강력한 도구로 부상하였다. B 세포 특이적 항원인 CD19를 표적으로 하는 양자 전달된 키메라 항원 수용체(CAR) 조작 T 세포를 활용한 이전의 시연은 특정 림프종 및 백혈병의 치료에 매우 효과적인 것으로 입증되었다. 액체 종양 및 유사한 고형 종양 표적의 서브셋으로 제한되는 CD19와 달리(전립선에서만 PSMA, 위장관 암에서만 GUCY2C 등), 데스모글레인-2(Dsg2)는 많은 건강한 조직에서 발현되고 거의 모든 고형 종양 세포 유형에서 보편적으로 과발현되는 종양 연관 항원이다(도 7).

[0316] Dsg2는 기저 수준에서 발현되고 정상 상피에서 세포 간 접합부 사이에 격리된 데스모솜 캐드헤린 단백질이지만, 형질전환된 악성 상피 세포의 표면에서는 크게 과발현된다. 많은 필수 조직(예를 들어 심장)에서 광범위한 발현을 반영하는 CAR 표적으로서 처음에는 직관에 어긋나지만, 이 고유한 세포 아래 발현 프로파일은 정상 상피에서 부수적인 독성 없이 Dsg2의 탈격리가 고형 종양에서 표적이 될 수 있는 사용 가능한 패러다임을 의미한다(도 8 및 도 14b). huma Dsg2 단백질을 표적으로 삼을 수 있는 독점 단클론성 항체(mAb)에서 적응된 단쇄 가변 단편(scFv)을 함유하는 CAR 작제물(도 9)이 개발되었다. Dsg2 지정 CAR-T 세포를 생산하는 T 세포에서 이러한 작제물의 발현은 다양한 암 세포주에서 뿐만 아니라 플레이트 코팅된 Dsg2 단백질에 의해 표면 Dsg2를 검출하는 능력을 부여한다(도 10). Dsg2 지정 CAR-T 세포는 Dsg2-녹아웃 세포에서 세포용해 없이 시험관 내에서 고형 종양 세포를 사멸시키며, 이는 Dsg2-특이성을 나타낸다(도 11). 더욱이, 마우스 Dsg2를 표적으로 하는 Dsg2 CAR-T 세포의 투여는 마우스에 투여 시 독성을 나타내지 않았다(도 13b). 함께, Dsg2 표적화 CAR은 T 세포에서 발현될 때 강력한 세포용해 이펙터 기능 및 항종양 효능을 제공한다. 더욱이, 다른 세포 유형(예를 들어 NK 세포)은 유사한 이점을 제공할 가능성이 높으며 CAR-T/NK 세포는 아래에 나열된 것(잠재적 변형, 조합, 및/또는 변이체)을 포함하되 이에 제한되지 않는 안전성 및 효능을 개선하기 위해 다른 전략과 변형 및/또는 결합될 수 있다.

[0317] 가장 기본적인 형태:

[0318] 1. T 세포는 환자로 부터 수집되고, Dsg2 CAR(도 9)는 세포로 조작되며 새로 형성된 CAR-T 세포는 동일한 환자에게 투여된다.

[0319] 또는

[0320] 2. NK 세포는 Dsg2 CAR을 대규모로 발현하도록 변형된 중앙집중식 공급원(혈액 은행 또는 제대혈 은행)에서 수집되며, Dsg2 발현 고형 종양이 있는 모든 환자에게 보관 및 투여되는 CAR-NK 세포를 생성한다. 이는 현재 사용되는 맞춤형 암 제한된 환자 특이적 CAR-T 세포 접근법과는 대조적으로 거의 모든 암 환자에게 사용할 수 있는 보편적인 기성품 Dsg2 CAR-NK 세포 요법을 위한 대규모 제조 접근법이다.

- [0321] CAR은 다양한 T 세포(예를 들어 $\alpha\beta$, $\gamma\delta$; CD4+, CD8+), 자연 살해 세포(예를 들어 NK-92, NK-92MI, NKL), 대식세포(예를 들어 M1, M2), 및 다른 세포 유형에서 발현될 수 있다.
- [0322] CAR은 1세대 CAR(scFv + CD3 ζ), 2세대 CAR(scFv + CD28/4-1BB/OX40/ICOS + CD3 ζ), 3세대 CAR 작제물(2세대 CAR 백본 + 추가의 CD28/4-1BB/OX40/ICOS), 4세대 CAR 작제물 또는 보편적인 사이토카인 매개 사멸을 위해 재지정된 T-세포(TRUCK), (2세대 CAR 백본 + 구성적/유도성 케모카인 [예를 들어 IL-2, IL-12, IL-15, 등] 성분), 또는 5세대 CAR(4세대 CAR + 사이토카인 수용체의 세포내 도메인 [예를 들어 IL-2R β]) 작제물일 수 있다.
- [0323] Dsg2 CAR은 유도성 카스파제 9("iCasp9"), 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-TK) 등과 같은 자살 유전자와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0324] Dsg2 CAR은 "DualCAR"(면역 세포당 하나 이상의 CAR) 및/또는 "TandemCAR"(하나 초과항원을 표적으로 하는 단일 2가/이중특이적 CAR) 포맷일 수 있다.
- [0325] Dsg2 CAR은 로직-게이트 CAR("OR", "AND" 및 "NOT" 부울(Boolean)-게이트 안전 스위치) 포맷일 수 있다.
- [0326] Dsg2 CAR은 "iCAR"(PD-1, CTLA-4 등에 접합된 정상 조직 항원 특이적 억제 CAR)과 조합하여 사용할 수 있다.
- [0327] Dsg2 CAR은 "SynNotch"(합성 노치 수용체) CAR일 수 있다.
- [0328] 면역 세포는 CRISPR/Cas9 변형 면역 세포(예를 들어 PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 등의 제거)일 수 있다.
- [0329] Dsg2 CAR은 면역 체크포인트 차단 요법(항-PD-1/PD-L1, 항-CTLA-4, 항-TIM-3 등)과 함께 사용될 수 있다.
- [0330] Dsg2 CAR은 입양 전달 전/동안/후에 사이토카인(IL-2, IL-15, IL-18 등)의 첨가와 함께 사용할 수 있다.
- [0331] Dsg2 CAR은 백신 접종 또는 종양용해 바이러스와 함께 사용할 수 있다.
- [0332] Dsg2 CAR은 Dsg2의 종양 특이적 변이(돌연변이, 절단 생산, 차등 글리코실화 등)의 표적화에 사용될 수 있다.
- [0333] Dsg2 CAR은 CAR-T 세포 귀소의 변형(IV 대 IP 대 국소/국부 전달, 귀소 분자의 CRISPR-표적화, 귀소 분자 이식 유전자 전달) 등에 사용될 수 있다.

[0334]

실시예 3: 서열:

표 1: 6D8 항체

	서열번호	서열	서열번호	서열
중쇄				
CDR1	1	ggctacacggtcaccaactacggt	2	gytftnyg
CDR2	3	atcaatacttacaccggtaatcca	4	intytgnp
CDR3	5	gctcgcgacaggggcaactcctcgactat	6	ardrgnsfdy
전장	7	cagatccagctgtgcagagcggccccgagctgaagaagccccgggagactgtcaagatctcttgcaaggcgtccggctacacgttcaccaactacggtatgaactgggtgaagcaggccccggcgtggctgaatggatgggtggatcaatactacaccggtaatccaactacgcggatgactcaagggccgcttcgattttcgtggagacctcgctagcactgcctacctgcaaatcaaacctcaaaaacgaggacatggccatctatttctgtcctcgcgacaggggcaactcctcgactattggggccagggtaccactgaccgtctctct	8	qiqlvqsgpelkkpgetvkisckasgytftnygmnwvkqapgrglkwmgwintytgnptyaddfkgrdfsfletsastaylqinnlknedmaiycfardrgnsfdywgqgtitvss
경쇄				
CDR1	9	gagaacatctactcgaac	10	eniysn
CDR2	11	atgccatt	12	iai
CDR3	13	cagcactttggggcactccgcgcacc	14	qhfwgtprt
전장	15	gacatccagatgaccagagccctgctagtctctccgtgccgtggcgagacggtgaccatcacctgccgcacatccgagaaatctactcgaacctggcctgtaccagcagaagcagggaagagccctcagctgctgggtgacatgccattaacctggcgagggcgtaccctcgttttcagggaagcggctcggggaccagtagctaaaaattaattccctcagtcgaagattcggcaactattactgtcagcactttggggcactccgcgcacctcggcggaggtaccagctggagatcaag	16	diqumtqspaslsvsgetvtitcraseniysnla wyqqkqgkspqllvyiainladgvpsrfsqsgsgtqyslkinslqsedfgnyycqhfwgtprtfgggtkleik

[0335]

표 2: 10D2 항체

	서열번호	서열	서열번호	서열
중쇄				
CDR1	17	agctacatcttgc	18	syilh
CDR2	19	tatattaacccgtacaacgacgcca ccaagtacaacgagaaatthaagg gc	20	yinpyndatkynef kg
CDR3	21	acaccacagcctat	22	ittay
전장	23	gagggtgcagctgcagcagagcgg gcccagagctgggaatccaggcgc gtcagtgaaagatgtcatgcaaagct tctggctactcctcaccagctacat cttgcaattgggtcaagcagaagcct ggacagggctggagtgatcggtt atattaaccgtacaacgacgcca ccaagtacaacgagaaatthaagg gcaaggccacgctactagcgata aaagctcgtccacggcctacatgg aattgagttccgtcacctccagga cagcgcgggtactactgtgtctta tgatcaccacagcctattggcgta ctggggccagggcactctgttaca gtatctgct	24	evqlqqsgpelvnp gasvkmsckasgy sftsylhwvkqkpg qglewigyinynd atkynefkkgkatits dksstaymeissvt sedsavyycsmitt aywaywgqgtlvtv sa
경쇄				
CDR1	25	aaatcctctcaatctatcctgtacgg ctcgaccagaagaactacctggc a	26	kssqsilygstqknyl a
CDR2	27	tgggcttcactcgtgagagc	28	wastres
CDR3	29	caccagtagcttgcagctacacc	30	hqylssyt
전장	31	aacatcatgatgaccagagcccg tcgtccctcaccgtgtccgctggcg agaaggtgaccatgtcttgcaaatc ctctcaatctatcctgtacggctcga cccagaagaactacctggcatggt accagcagaagcccggcagag ccctaagctgctgattattgggcttc cactcgtgagagcgggtccccga ccgcttcaccggctccggctccggc accgacttcaccctgaccatcttctc	32	nimmtqspssltvs agekvtmsckssqs ilygstqknylawyq qkpgqspklliywas tresgvpdrftgsgs gtdfitissvqaedla vyychqylssyftgg gtkleik

		cgtcaggccgaagatctggccgt gtattactgtcaccagtagcttctga gtacaccttcggcgggtggcactaa gttagagatcaag		
--	--	---	--	--

서열번호: 33 - 6D8-28BBz_CAR_(DNA)

CD8 선도 서열(nt 1-63); 6D8 scFv(nt 64..798); 6D8 카파 경쇄(nt 64..384); 6D8 카파 경쇄 CDR1(nt 142..159); 6D8 카파 경쇄 CDR2(nt 211..219); 6D8 카파 경쇄 CDR3(nt 328..354); 링커(nt 385..447); 6D8 중쇄(nt 448..798); 6D8 중쇄 CDR1(nt 523..546); 6D8 중쇄 CDR2(nt 598..621); 6D8 중쇄 CDR3(nt 736..765); CD8 힌지(nt 799..933); CD8 막형단(nt 934..1005); CD28 ICD(nt 1006..1128); 4-1BB ICD(nt 1129..1254); CD3 ζ ICD(nt 1255..1590)

atggcattgcctgttacagctctgctgctgccctggctctgcttctgcatgctgccagacctgacatccagatgaccagagccc
 tgctagtctctccgtgccgttgccgagacgggtgaccatcacctgccgcgcatccgagaacatctactcgaacctggcctgttac
 cagcagaagcagggcaagagccctcagctgctggtgtacatcgccattaacctggcggacggcgtaccctctcggtttcagg
 gagcggctcggggaccagctacagctctaaaaattaattccctcagctccaagatttcggcaactattactgtcagcacttttggg
 cactccgcgcaccttcggcggagggtaccaagctggagatcaagtcgggcggaggaggcagcggcggcgggggtccgggtg
 gagcggctctggcggcgggggttctcagatccagctgtgcagagcggccccgagctgaagaagccccggggagactgtca
 agatctcttcaaggcgtccggctacacgttcaccaactacggtatgaactgggtgaagcaggccccggggcgtggcttgaat
 ggatgggttgatcaatacttacaccgtaataccaactacgcggatgactcaaggccgctcgtattttcgtggagacctcc
 gctagcactgcctacctgcaaaataacaacctcaaaaacgaggacatggccatctatttctgtgctcgcgacaggggcaactcct
 cgactattggggccagggtaccacactgaccgtctctctacaacaacctctcctcggcctctacaccagctctacaattg
 ccagccagcctctgtctctgaggcccgaagctgtagacctgctgctggcggagccgtgcatacaagaggactggatttcgct
 gcgacatctacatctgggctcctctggccggaacatgtggcgtgctgctgctgagcctggtcatccctgtactgccggtcaa
 gagaagcagactgtgcacagcgactacatgaacatgaccttagacggccccggacctaccagaaagcactaccagccttac
 gctcctcctcgggacttcgctgcctacagaagcaagcggggcagaagaagctgctgtacatctcaagcagccctcatgagg
 cccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagt
 aagttcagcagatccgctgacgcccctgcctacaagcagggacagaaccagctgtacaacgagctgaacctggggagaaga
 gaagagtacgactgctggacaagcggagaggcagagatcctgagatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaaga
 gggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaaggcgcgagcgcagaagag
 gcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgatgcctgcacatgcaggccctgcc
 tccaagatag

[0340]

[0341] 서열번호: 34 - 6D8-28BBz_CAR_(아미노산)

[0342] CD8 선도 서열(잔기 1..21); 6D8 scFV(잔기 22..266); 6D8 카파 경쇄(잔기 22..128); 6D8 카파 경쇄 CDR1(잔기 48..53); 6D8 카파 경쇄 CDR2(잔기 71..73); 6D8 카파 경쇄 CDR3(잔기 110..118); 링커(잔기 129..149); 6D8 중쇄(잔기 150..266); 6D8 중쇄 CDR1(잔기 175..182); 6D8 중쇄 CDR2(잔기 200..207); 6D8 중쇄 CDR3(잔기 246..255); CD8 힌지(잔기 267..311); CD8 막횡단(잔기 312..335); CD28 ICD(잔기 336..376); 4-1BB ICD(잔기 377..418); CD3 ζ ICD(잔기 419..530)

malpvtalllplalllhaarpdqmtqspaslsvsvgetvtitcraseniysnlawyqqkqgkspqllvyiainladgvpsrfsfsg
 sgsqtqyslkinlsqsedfngnyycqhfwtprtfgggkklksggggsgggsgggsgggsgqqlvqsgpelkkpget
 vkisckasgytftnygmnnvkwqapgrglkwmgwintygnptyaddfkgrfdslsastaylqinnlknedmaiifca
 rdrngsfdywgqgtlvtsttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitl
 ycrsksrllhsdymnmtprrpgprkhyqpyapprdfaayrskrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrpfpeeeegg
 celrvkfrsradapaykqgqnqlnelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeyseigm
 kgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[0343]

[0344] 서열번호: 35 10D2-28BBz_CAR_(DNA)

[0345] CD8 선도 서열(nt 1..63); 10D2 scFv(nt 64..816); 10D2 카파 경쇄(nt 64..399); 10D2 카파 경쇄 CDR1(nt 133..183); 10D2 카파 경쇄 CDR2(nt 229..249); 10D2 카파 경쇄 CDR3(nt 346..369); 링커(nt 400..462); 10D2 중쇄(nt 463..816); 10D2 중쇄 CDR1(nt 553..567); 10D2 중쇄 CDR2(nt 610..660); 10D2 중쇄 CDR3(nt 760..774); CD8 힌지(nt 817..951); CD8 막횡단(nt 952..1023); CD28 ICD(nt 1024..1146); 4-1BB ICD(nt 1147..1272); CD3 ζ ICD(nt 1273..1608)

atggcattgcctgttacagctctgctgctgccctggctctgctctgcatgctgccagacctaacatcatgatgacccagagccc
 gtcgtccctcaccgtgtccgctggcgagaaggtagacctgtcttcaaactctctcaatctatcctgtacggctcgaccagaaga
 actacctggcatggtaccagcagaagcccgggcagagccctaagctgctgattattgggctccactcgtgagagcgggggtcc
 ccgaccgcttcaccggctccggctccggcaccgacttcaccctgacctctctccgtgcaggccgaagatctggccgtgtatta
 ctgtcaccagtacctttcagctacaccttcggcgggtggcactaagttagatcaagtcgggcggggagggaagtggcgggg
 gtggtctggcggcgggtggtccggcggaggagggtccgaggtgcagctgcagcagagcgggcccagctggtgaatccag
 gcgctcagtgaaagtgtcatgcaaagcttctggctactcctcaccagctacatctgcatgggtcaagcagaagcctggaca
 gggctggagtggatcggttatattaacccgtacaacgacgccaccaagtacaacgagaaatftaagggaagccacgctca
 cttagcgataaaagctcgccacggcctacatggaattgagttccgtcacctccgaggacagcgcgggtgactactgttctctatg
 atcaccacagcctattggcgctactggggccagggcactctgttacagatctgctacaacaacccctgctcctcggcctctac
 accagctcctacaattgccagccagcctctgtctctgaggcccgaagctttagacctgctgctggcggagccgtgcatacaag
 aggactggatttcgctgcacatctacatctgggctcctctgcccgaacatgtggcgtgctgctgctgagcctggtcatcacc
 ctgtactgccggccaagagaagcagactgctgcacagcagctacatgaacatgacccctagacggcccggacctaccagaa
 agcactaccagccttacgctcctcctcgggacttcgctgcctacagaagcaagcggggcagaaagaagctgctgtacatcttca
 agcagccctcatgcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcg
 gctgagctgagagtgaaagtgcagagatccgctgacgcccctgcctacaagcaggggacagaaccagctgtacaacgagct
 gaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggacaagcggagagggcagagatcctgagatggcggcgaagcccaga
 cggagaatcctcaagaggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaag
 ggcgagcgcagaagaggcaaggacacgatggactgtaccaggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgatgccctg
 cacatgcaggccctgcctccaagatag

[0346]

[0347]

[0348]

[0349]

서열번호: 36 10D2-28BBz_CAR_(아미노산)

CD8 선도 서열(잔기 1..21); 10D2 scFv(잔기 22..272); 10D2 카파 경쇄(잔기 22..133); 10D2 카파 경쇄 CDR1(잔기 45..61); 10D2 카파 경쇄 CDR3(잔기 77..83); 10D2 카파 경쇄 CDR3(잔기 116..123); 링커(잔기 134..154); 10D2 중쇄(잔기 155..272); 10D2 중쇄 CDR1(잔기 185..189); 10D2 중쇄 CDR2(잔기 204..220); 10D2 중쇄 CDR3(잔기 254..258); CD8 힌지(잔기 273..317); CD8 막횡단(잔기 318..341); CD28 ICD(잔기 342..382); 4-1BB ICD(잔기 383..424); CD3 ζ ICD(잔기 425..536)

malpvtalllplalllhaarprnimmtqspssltsagekvtmsckssqsilystqknylawyqqkpgqspklliywastres
 gvpdrftgsgtdflitissvqaedlavyychqylssytfgggkklleiksgggsgggsgggsgggsgggsevqlqqsgpelv
 npgasvkmsckasgysftsylhwkqkpgqglewigyinyndatkynekfkkatltsdkssstaymelsvtsedsa
 vyyccsmittaywaywgqgtlvtsattpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg
 vllslvitlycrskrsrllhsdymnmtprrpgptrkhyqpyapprdfaayrskrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrif
 peeeeggcelrvkfrsadapaykqqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae
 ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

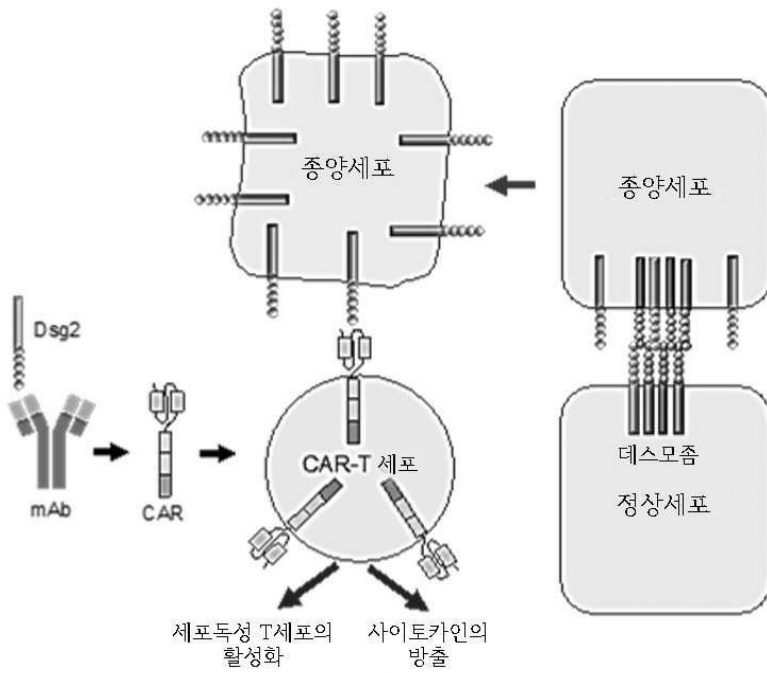
[0350]

[0351]

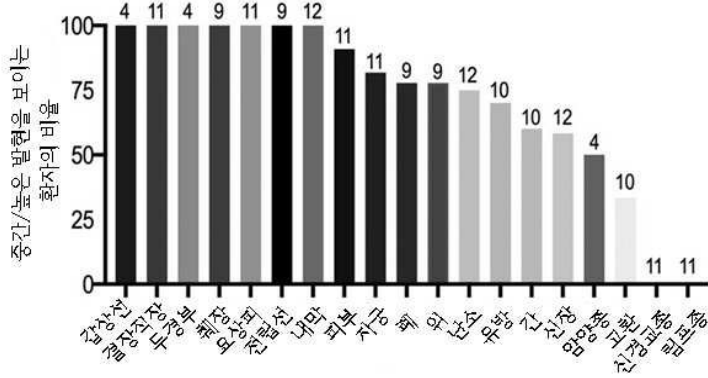
본 명세서에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시내용은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다. 본 발명이 특정 구현예를 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명의 다른 구현예 및 변형이 당업자에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 구현예 및 등가 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

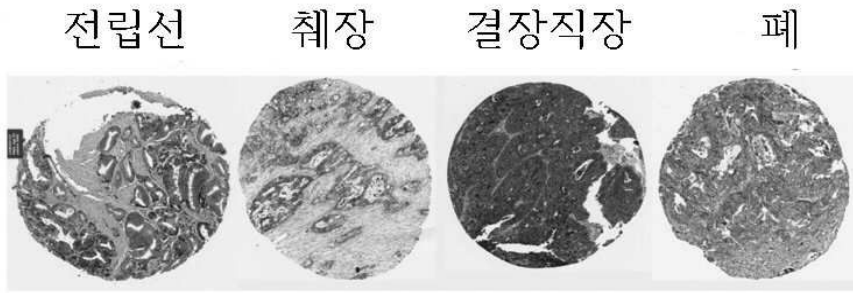
도면1



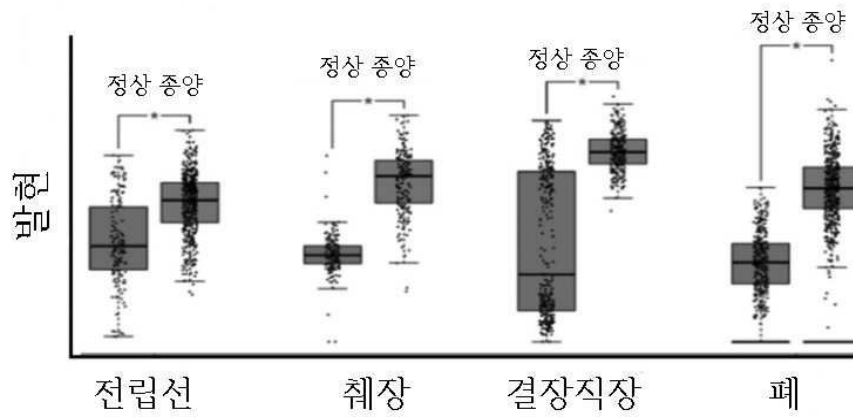
도면2a



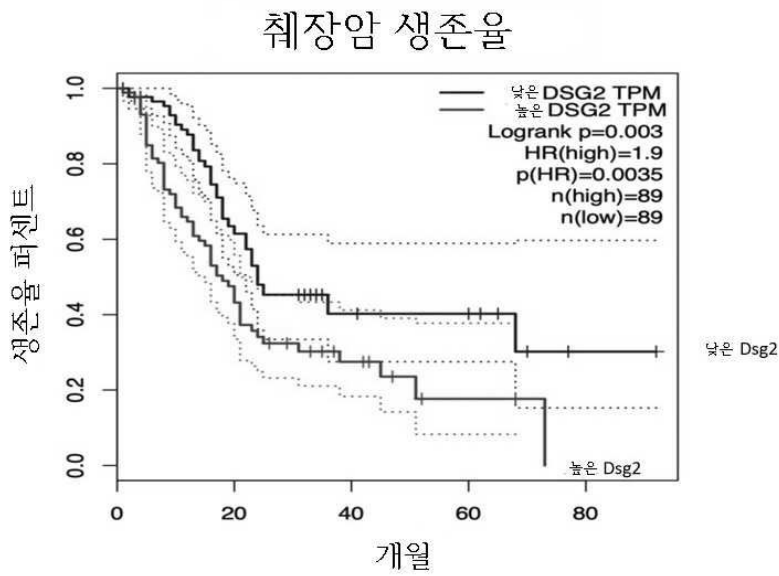
도면2b



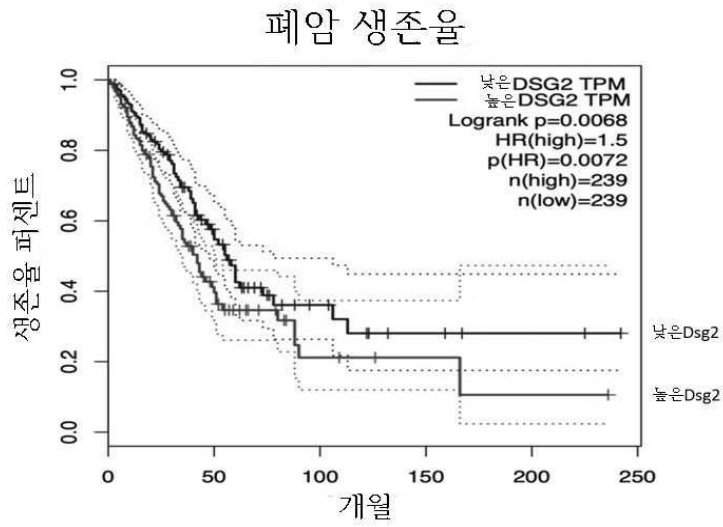
도면2c



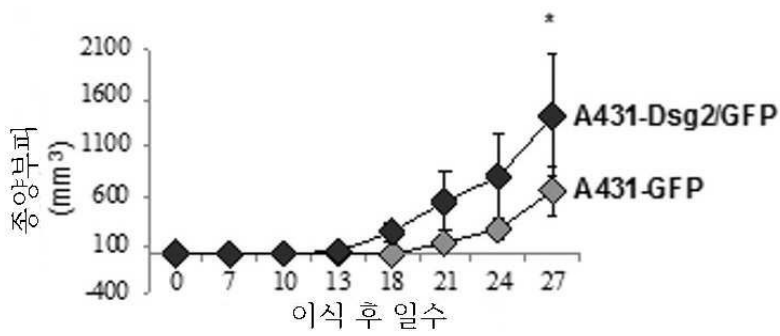
도면2d



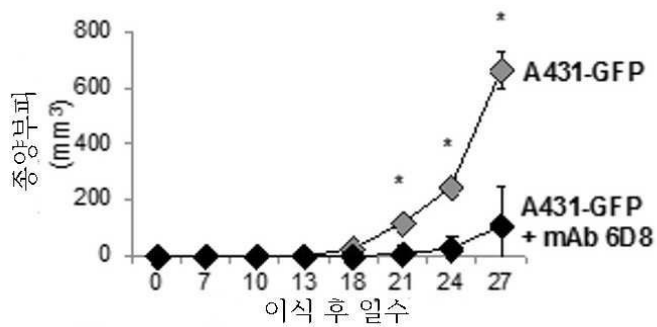
도면2e



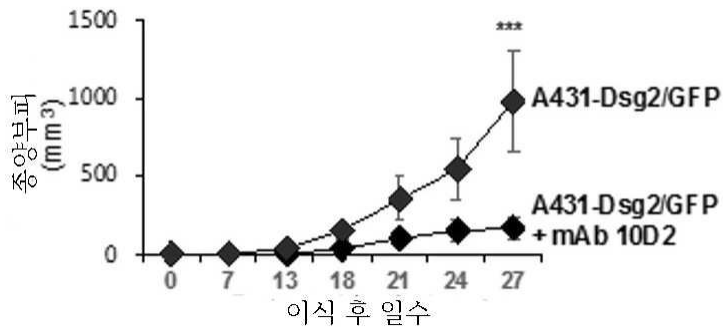
도면3a



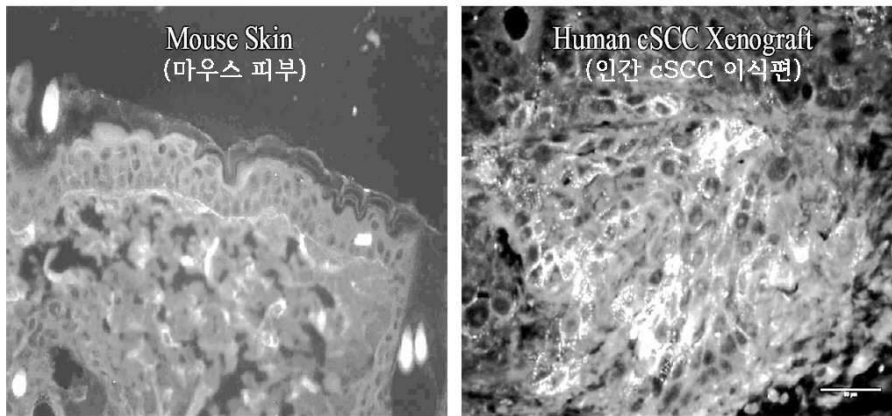
도면3b



도면3c



도면4



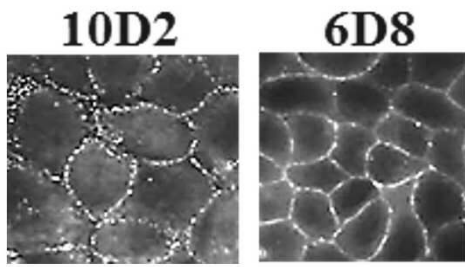
도면5a



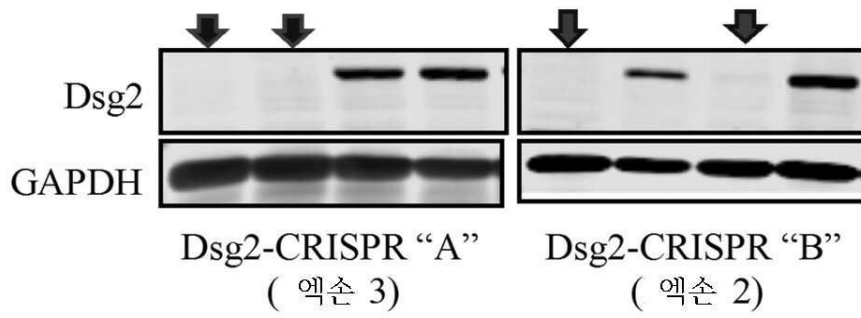
도면5b



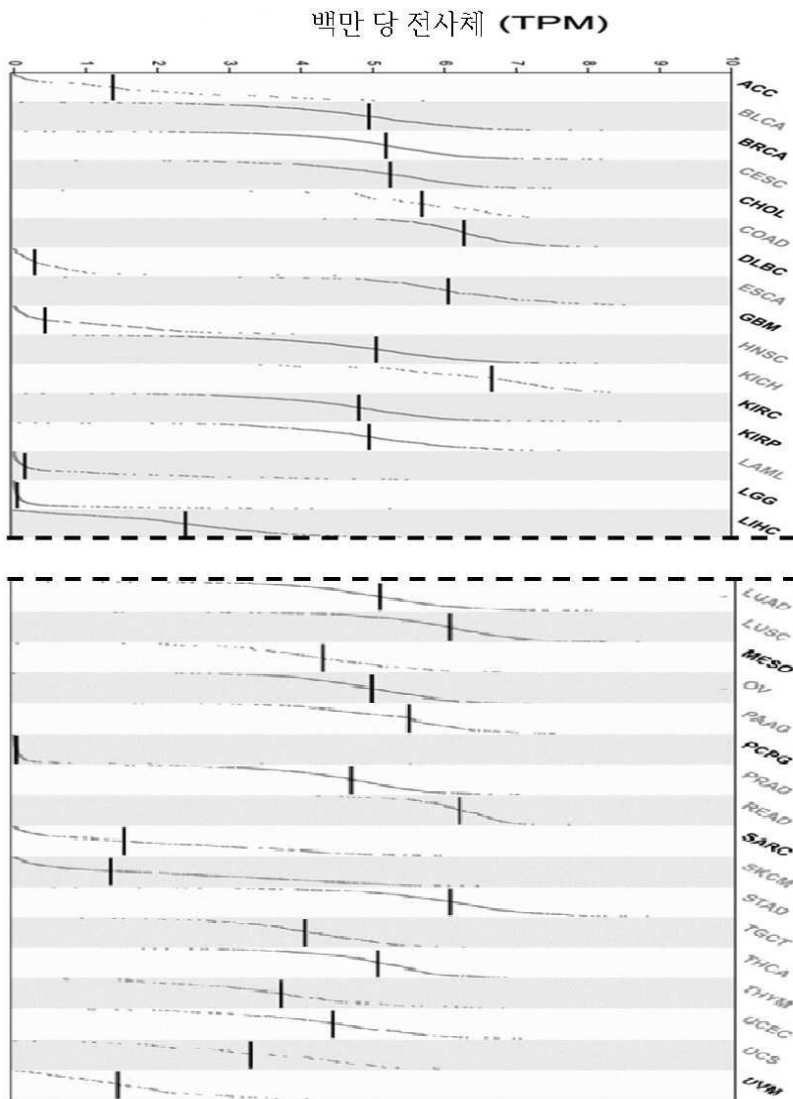
도면5c



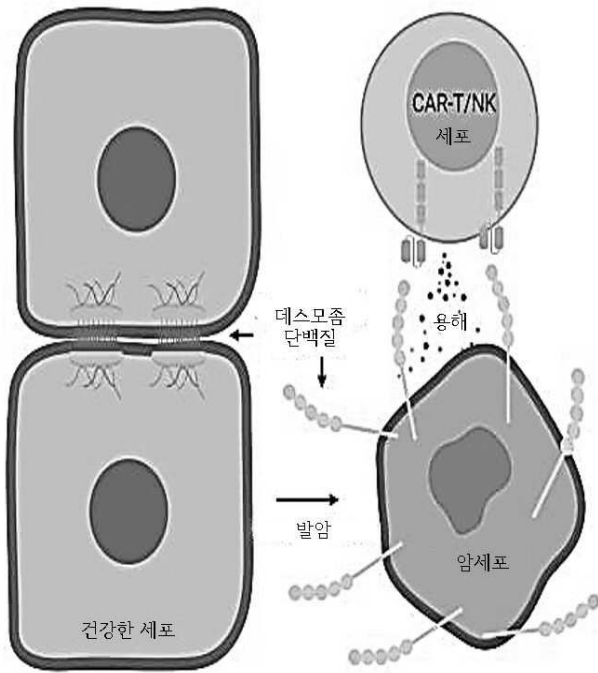
도면6



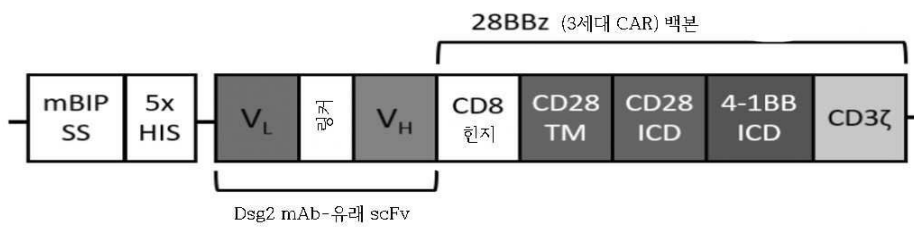
도면7



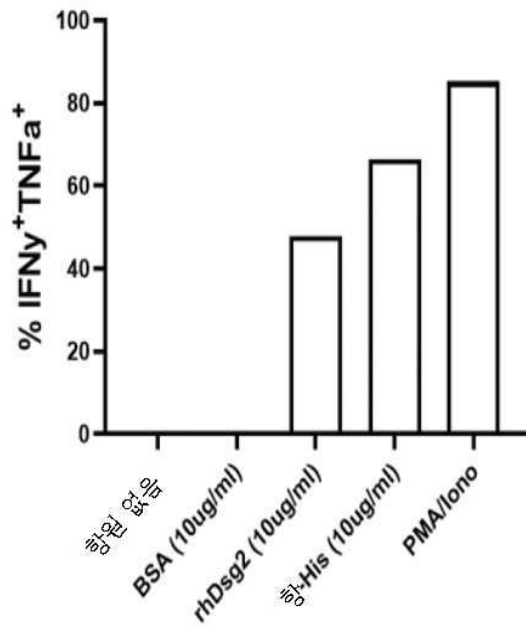
도면8



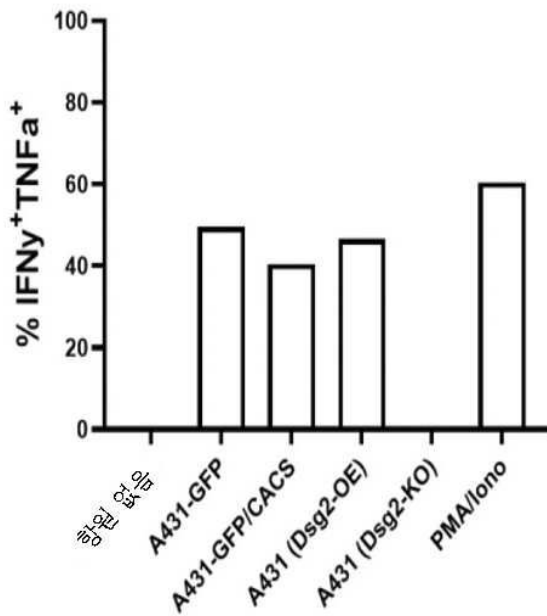
도면9



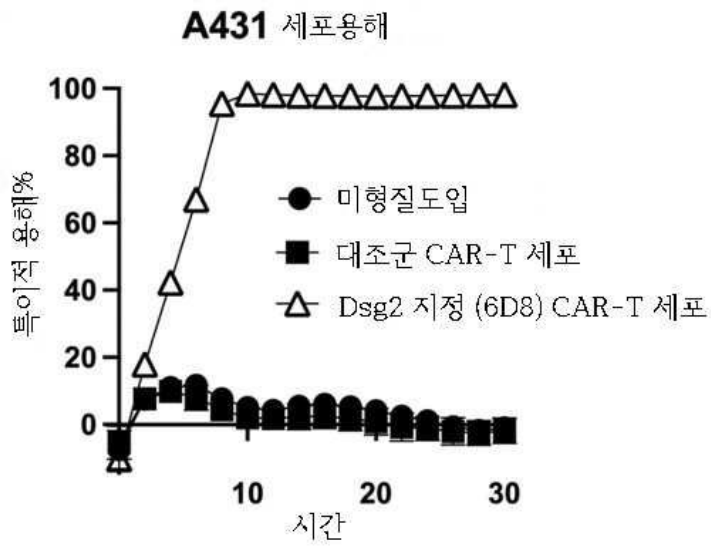
도면10a



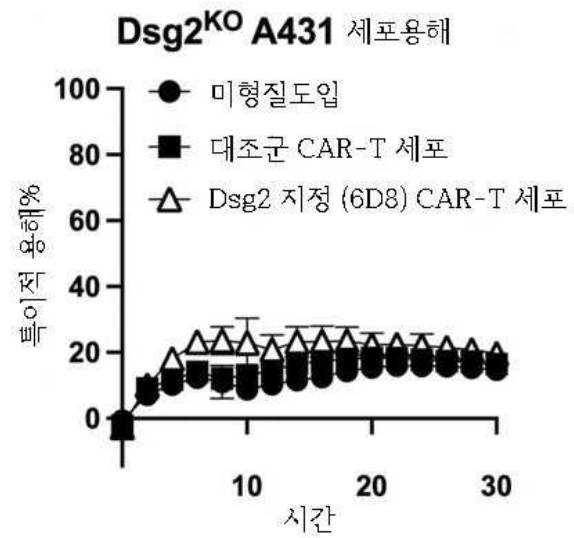
도면10b



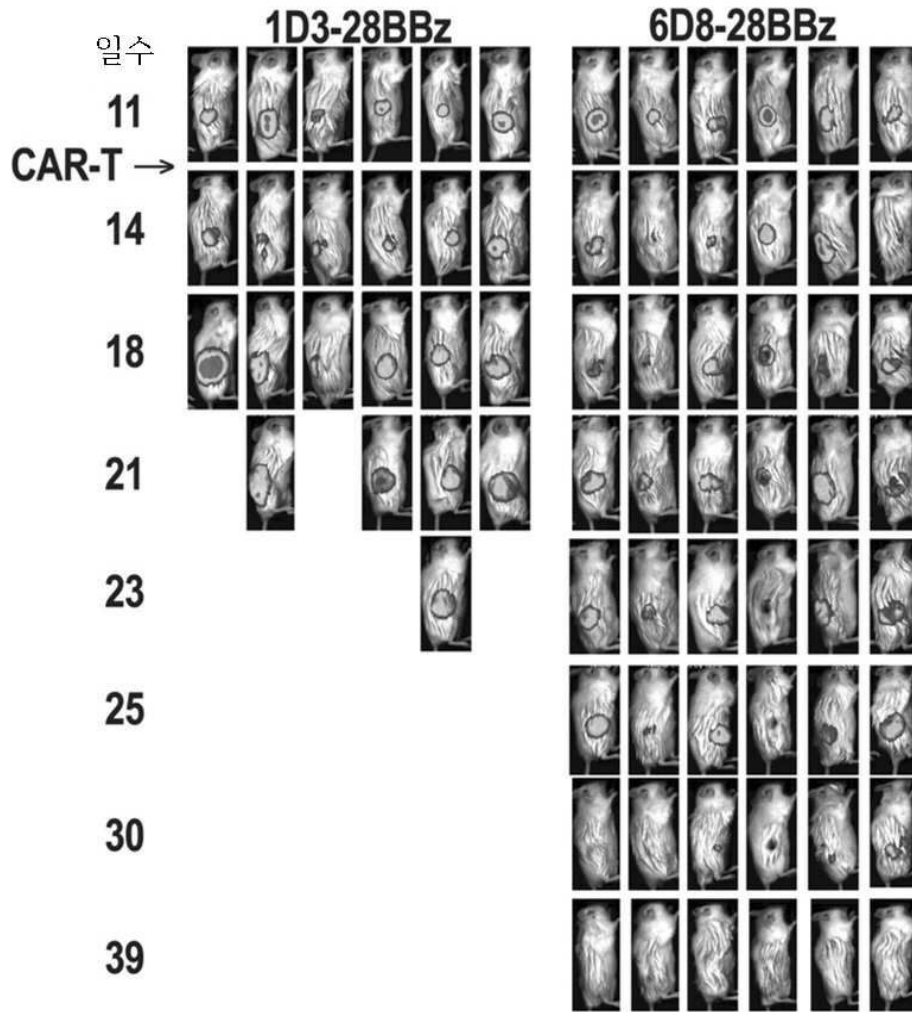
도면11a



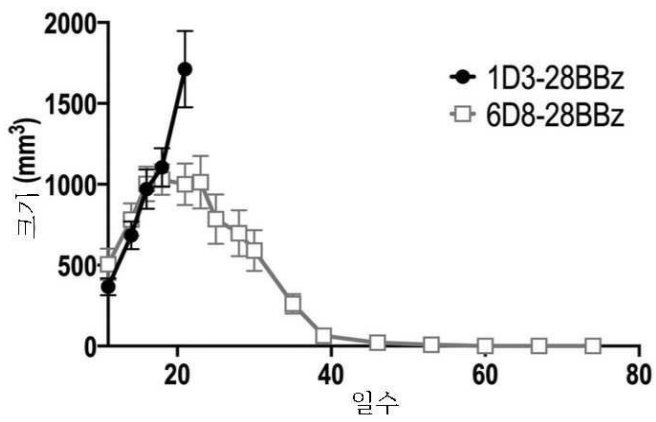
도면11b



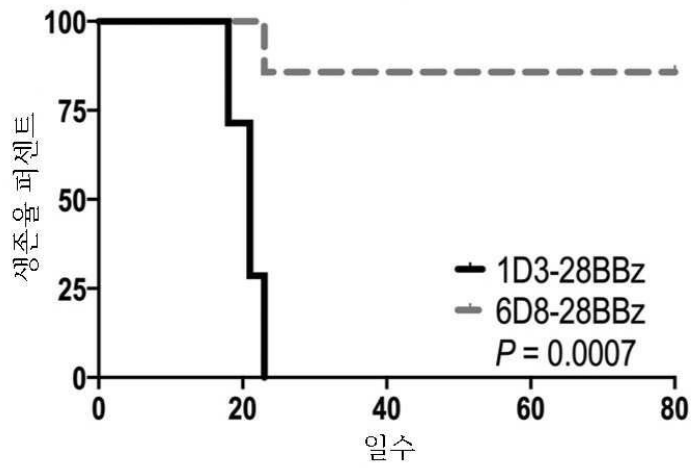
도면12a



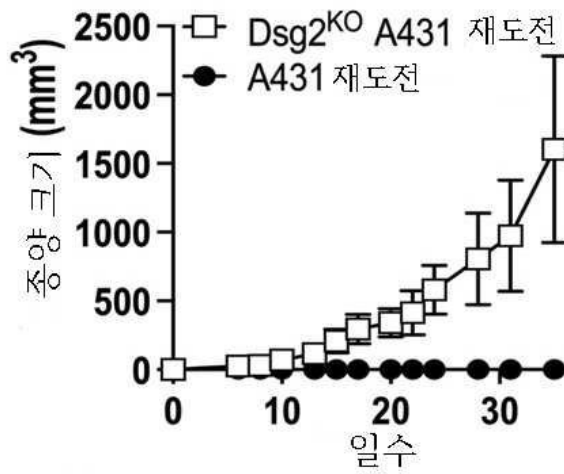
도면12b



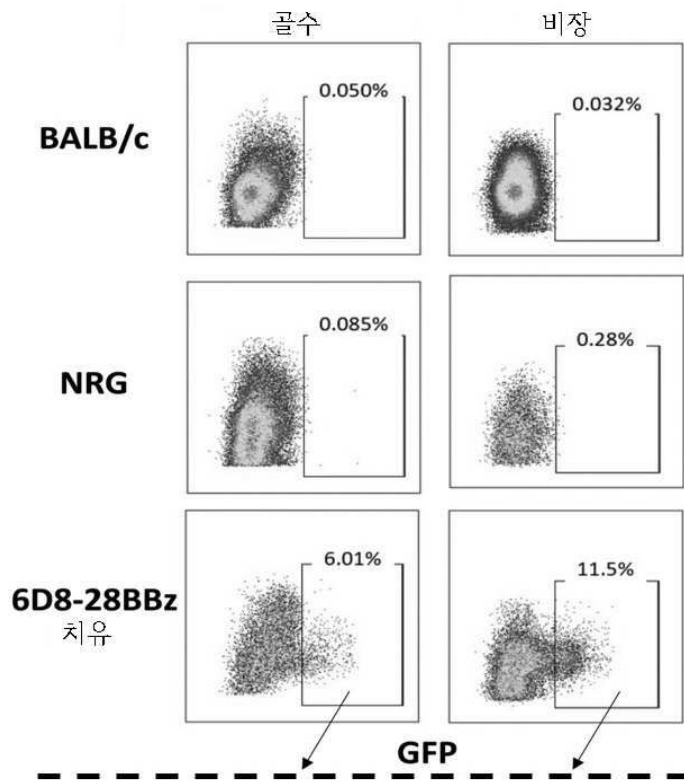
도면12c



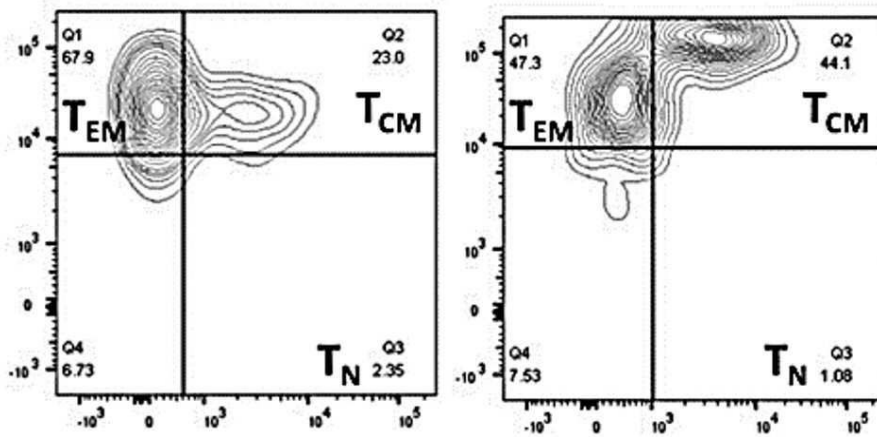
도면13a



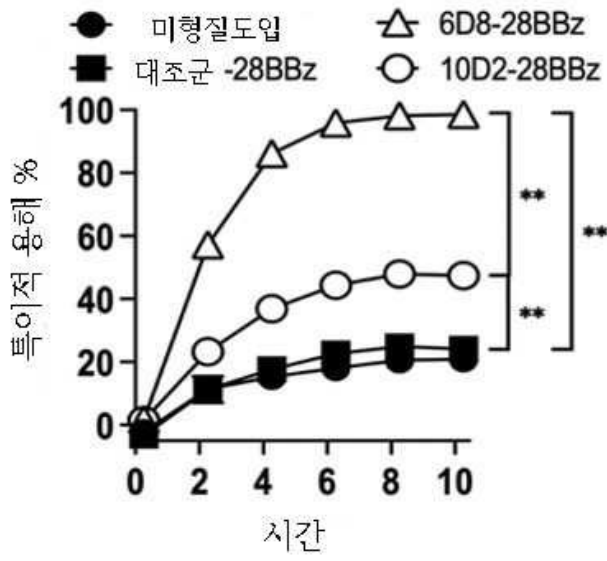
도면13b



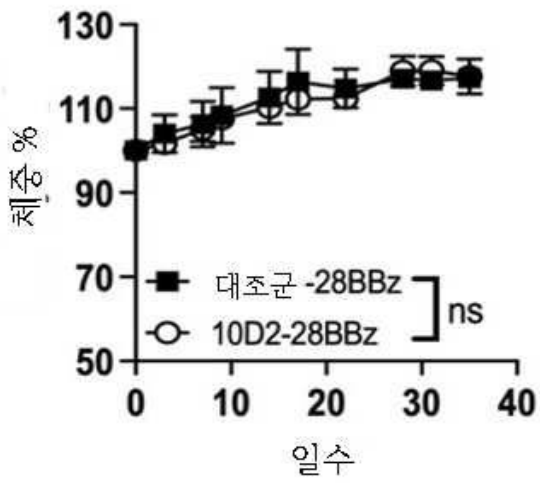
도면13c



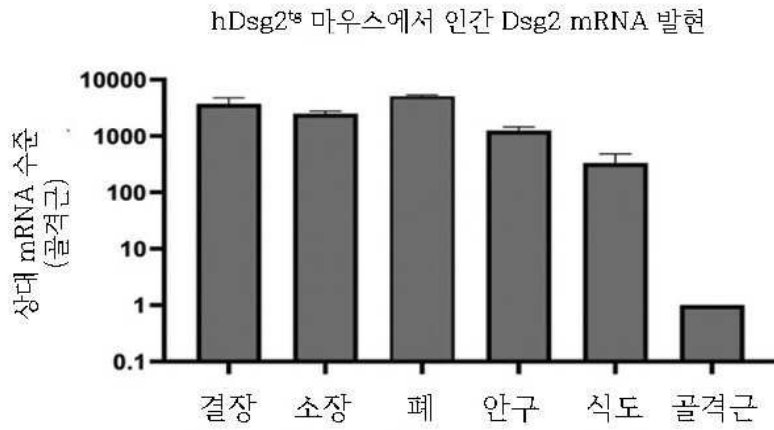
도면14a



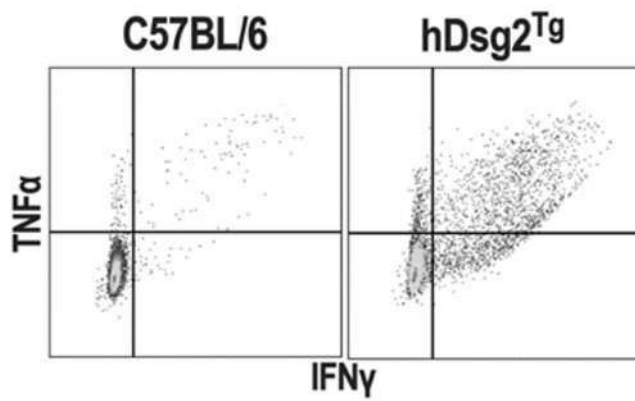
도면14b



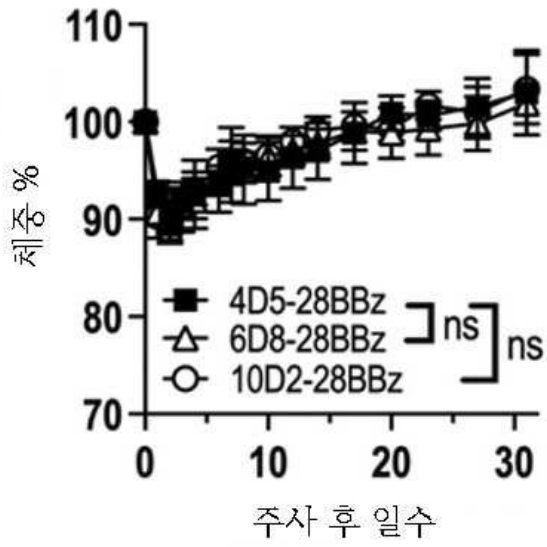
도면14c



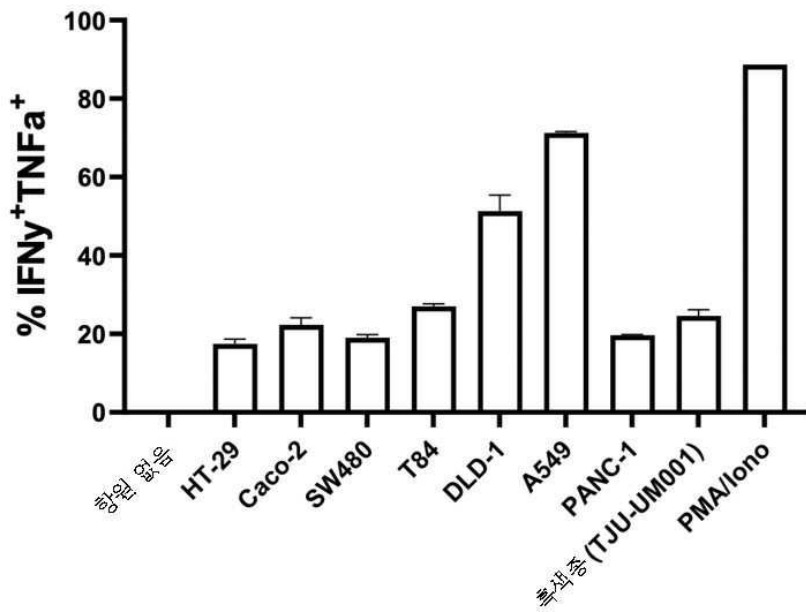
도면14d



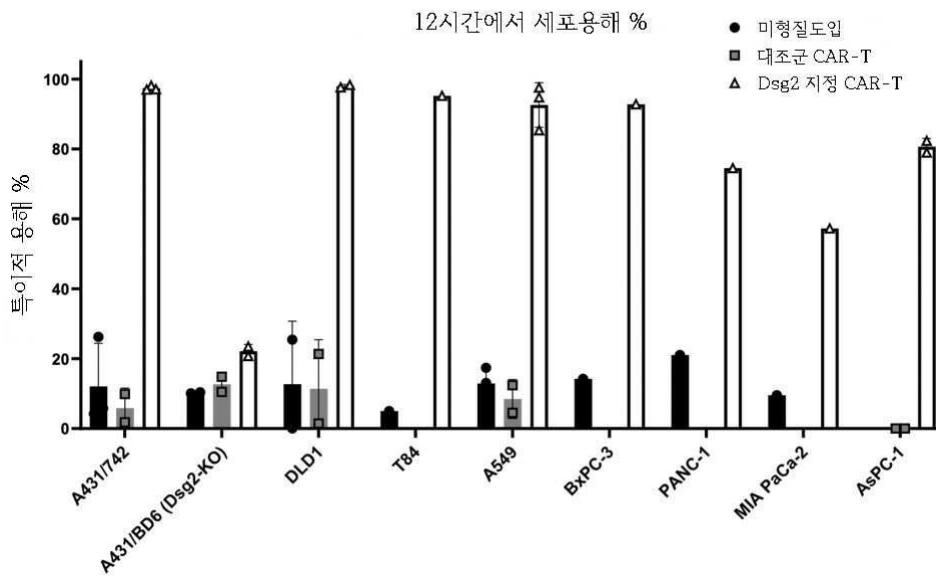
도면14e



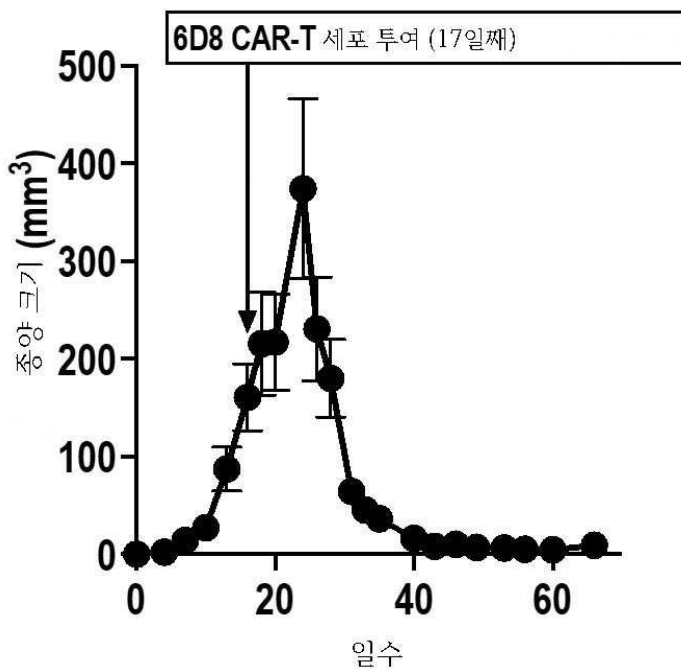
도면15a



도면15b



도면16



서열 목록

<110> Thomas Jefferson University

Snook, Adam Eugene

Mahoney, My Georgia

Carlson, Robert Devlin

<120> Desmoglein 2-directed chimeric antigen receptor (CAR) constructs and methods of use

<130> 205961-0037-00W0

<150> US 63/120,356

<151> 2020-12-02

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR1

<400> 1

ggctacacgt tcaccaacta cgg

24

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR1

<400> 2

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly

1 5

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR2

<400> 3

atcaatactt acaccggtaa tcca

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR2

<400> 4

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro

1 5
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR3
 <400> 5
 gctcgcgaca ggggcaactc cttcgactat 30
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC CDR3
 <400> 6

Ala Arg Asp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 7
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC
 <400> 7
 cagatccagc ttgtgcagag cggcccccag ctgaagaagc ccggggagac tgtcaagatc 60
 tcttgcaagg cgtccggcta cacgttcacc aactacggta tgaactgggt gaagcaggcc 120
 ccggggcgtg gcttgaaatg gatgggttgg atcaatactt acaccggtaa tccaacttac 180
 gcggatgact tcaagggccg cttcgatttt tcgctggaga cctccgctag cactgcctac 240
 ctgcaaatta acaacctcaa aaacgaggac atggccatct atttctgtgc tcgcgacagg 300
 ggcaactcct tcgactattg gggccagggt accacactga ccgtctcttc t 351
 <210> 8
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody HC

<400> 8

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Ile Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody LC CDR1

<400> 9

gagaacatct actcgaac

18

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody LC CDR1

<400> 10

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody LC
 <400> 15
 gacatccaga tgaccagag ccctgctagt ctctccgtgt ccgttggcga gacggtgacc 60

 atcacctgcc ggcacccga gaacatctac tcgaacctgg cctggtacca gcagaagcag 120
 ggcaagagcc ctgagctgct ggtgtacatc gccattaacc tggcggacgg cgtaccctct 180
 cggttttcag ggagcggctc ggggaccag tacagtctaa aaattaattc ctttcagtcc 240
 gaagatttcg gcaactatta ctgtcagcac ttttggggca ctccgcgcac cttcggcgga 300
 ggtaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 6D8 Antibody LC

<400> 16
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ile Ala Ile Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR1
 <400> 17
 agctacatct tgcac

15

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR1
 <400> 18

Ser Tyr Ile Leu His

1 5

<210> 19
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR2
 <400> 19

tatattaacc cgtacaacga cgccaccaag tacaacgaga aatttaaggg c

51

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR2

<400> 20

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 14
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR3

<400> 21

acaccacagc ctat

14

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC CDR3

<400> 22

Ile Thr Thr Ala Tyr

1 5

<210> 23

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC

<400> 23

gaggtgcagc tgcagcagag cgggcccag ctggtgaatc caggcgcgctc agtgaagatg 60

tcatgcaaag ctcttgctca ctccttcacc agctacatct tgcattgggt caagcagaag 120

cctggacagg gtctggagtg gatcggttat attaaccgt acaacgacgc caccaagtac 180

aacgagaaat ttaagggcaa ggccacgctc actagcgata aaagctcgtc cacggcctac 240

atggaattga gttccgtcac ctccgaggac agcgcggtgt actactgttg ctctatgatc 300

accacagcct attgggcgta ctggggccag ggcactcttg ttacagtatc tgct 354

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody HC

<400> 24

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Asn Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Ile Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Val Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Cys Ser Met Ile Thr Thr Ala Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR1

<400> 25

aaatcctctc aatctatcct gtacggctcg acccagaaga actacctggc a 51

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR1

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Thr Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 27

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR2
 <400> 27
 tgggcttcca ctctgagag c 21
 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR2
 <400> 28
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <
 210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR3
 <400> 29
 caccagtacc tttcgageta cacc 24
 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC CDR3
 <400> 30
 His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC

<400> 31
 aacatcatga tgaccagag cccgtcgtcc ctaccgtgt ccgctggcga gaagtgacc 60
 atgtcttgca aatcctctca atctatcctg tacggctcga cccagaagaa ctacctggca 120
 tggtagcagc agaagcccgg gcagagccct aagctgctga tttattgggc ttccactcgt 180
 gagagcgggg tccccgaccg cttcaccggc tccggctcgg gcaccgactt caccctgacc 240
 atctcttcgg tgcaggccga agatctggcc gtgtattact gtcaccagta ctttctgagc 300
 tacaccttcg gcggtggcac taagttagag atcaag 336

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2 Antibody LC

<400> 32

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Gly
 20 25 30
 Ser Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33

<211> 1593

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8-28BBz_CAR

<400> 33

atggcattgc ctgttacagc tctgtctgtg cccttgctc tgcttctgca tgctgccaga 60
 cctgacatcc agatgaccca gagccctgct agtctctccg tgtccgttgg cgagacggtg 120
 accatcacct gccgcgcatc cgagaacatc tactcgaacc tggcctggta ccagcagaag 180
 cagggcaaga gccctcagct gctggtgtac atcgcatta acctggcgga cggcgtacce 240
 tctcggtttt cagggagcgg ctcggggacc cagtacagtc taaaaattaa ttcccttcag 300

 tccgaagatt tcggcaacta ttactgtcag cacttttggg gcaactccgcg caccttcggc 360
 ggaggtacca agctggagat caagtcgggc ggaggaggca gcggcggcgg gggttcgggt 420
 ggaggcggct ctggcggcgg gggtttctcag atccagcttg tgcaagcgg ccccagactg 480
 aagaagcccc gggagactgt caagatctct tgcaagcgt ccggctacac gttcaccaac 540
 tacggtatga actgggtgaa gcagcccccg gggcgtggct tgaatggat gggttggatc 600
 aatacttaca ccgtaatcc aacctacgcg gatgacttca agggccgctt cgatTTTTcg 660
 ctggagacct ccgctagcac tcctacctg caattaaca acctcaaaaa cgaggacatg 720

 gccatctatt tctgtctcg cgacaggggc aactccttcg actattgggg ccagggtacc 780
 aactgaccg tctcttctac aacaaccct gctcctcggc ctctacacc agctcctaca 840
 attgccagcc agcctctgtc tctgagccc gaagcttgta gacctgctgc tggcggagcc 900
 gtgcatacaa gaggactgga ttctgcctgc gacatctaca tctgggctcc tctggccgga 960
 acatgtggcg tgctgtctg gacctgtgtc atcacctgt actgccggtc caagagaagc 1020
 agactgctgc acagcacta catgaacatg acccctagac ggcccggacc taccagaaag 1080
 cactaccagc cttacgctcc tcctcgggac ttcgctgcct acagaagcaa gcggggcaga 1140

 aagaagctgc tgtacatctt caagcagccc ttcattcggc ccgtgcagac cacacaagag 1200
 gaagatggct gctcctgcag attccccgag gaagaagaag gcggctgcga getgagagtg 1260
 aagttcagca gatccgctga cgccctgcc tacaagcagg gacagaacca gctgtacaac 1320
 gagctgaacc tggggagaag agaaggtac gacgtgtgg acaagcggag aggcagagat 1380
 cctgagatgg gcggcaagcc cagacggaag aatcctcaag agggcctgta taatgagctg 1440
 cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatcggaa tgaaggcga gcgcagaaga 1500
 ggcaagggac acgatggact gtaccagggc ctgagcaccg ccaccaagga tacctatgat 1560

 gcctgcaca tgcaggcct gcctccaaga tag 1593

<210> 34

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 6D8-28BBz_CAR

<400> 34

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu

20 25 30

Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser

50 55 60

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ile Ala Ile Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile

85 90 95

Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe

100 105 110

Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu

145 150 155 160

Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

165 170 175

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg

180 185 190

Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr

195 200 205

Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser

210 215 220

Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met

225 230 235 240
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp
 245 250 255

 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 260 265 270
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 275 280 285
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 290 295 300
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 305 310 315 320
 Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg

 325 330 335
 Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 340 345 350
 Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 355 360 365
 Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
 370 375 380
 Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
 385 390 395 400

 Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
 405 410 415
 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys
 420 425 430
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 435 440 445
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 450 455 460
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

 465 470 475 480

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 485 490 495
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 500 505 510
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 515 520 525
 Pro Arg
 530

- <210> 35
- <211> 1611
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized, 10D2-28BBz_CAR

<400> 35

atggcattgc ctgttacagc tctgctgctg cccttgctc tgcttctgca tgctgccaga 60
 cctaacaatca tgatgacca gagcccgctg tcctcaccg tgtccgctgg cgagaagggtg 120
 accatgtctt gcaaatcctc tcaatctatc ctgtacggct cgaccagaa gaactacctg 180
 gcatgttacc agcagaagcc cgggcagagc cctaagctgc tgatttatg ggcttccact 240
 cgtgagagcg gggccccga ccgcttcacc ggctccggct ccggcaccga cttcacctg 300
 accatctctt ccgtgcaggc cgaagatctg gccgtgtatt actgtcacca gtacctttcg 360

 agctacacct tcggcgggtgg cactaagtta gagatcaagt cgggcggggg aggaagtggc 420
 ggggggtggtt ctggcggcgg tggttccggc ggaggagggt ccgaggtgca gctgcagcag 480
 agcgggcccc agctggtgaa tccaggcgcg tcagtgaaga tgtcatgcaa agcttctggc 540
 tactccttca ccagctacat cttgcattgg gtcaagcaga agcctggaca gggcttggag 600
 tggatcggtt atattaacc gtacaacgac gccaccaagt acaacgagaa atttaagggc 660
 aaggccacgc tactagcga taaaagctcg tccacgcct acatggaatt gagttccgctc 720
 acctccgagg acagcgcggt gtactactgt tgctctatga tcaccacagc ctattgggcg 780

 tactggggcc agggcactct tgttacagta tctgtacaa caaccctgc tectcggcct 840
 cctacaccag ctctacaat tgccagccag cctctgtctc tgaggccccga agctttaga 900
 cctgtgctg gcgagccgt gcatacaaga ggactggatt tcgcctgcga catctacatc 960
 tgggctcctc tggccggaac atgtggcgtg ctgctgctga gcctggatcat caccctgtac 1020
 tgccggtcca agagaagcag actgctgcac agcgactaca tgaacatgac ccctagacgg 1080

cccggaccta ccagaaagca ctaccagcct tacgtctctc ctcgggactt cgctgcctac 1140
 agaagcaagc ggggcagaaa gaagctgctg tacatcttca agcagccctt catgcggccc 1200

 gtgcagacca cacaagagga agatggctgc tctgcagat tccccgagga agaagaagc 1260
 ggctgcgagc tgagagtgaa gttcagcaga tccgctgacg cccctgccta caagcagga 1320
 cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga cgtgctggac 1380
 aagcggagag gcagagatcc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa tctcaagag 1440
 ggctgtata atgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggaatg 1500
 aagggcgagc gcagaagagg caagggacac gatggactgt accagggcct gaggaccgcc 1560
 accaaggata cctatgatgc cctgcacatg caggccctgc ctccaagata g 1611

<210> 36
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized, 10D2-28BBz_CAR
 <400> 36

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Thr Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 35 40 45

 Ser Ile Leu Tyr Gly Ser Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 50 55 60
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
 65 70 75 80
 Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 85 90 95
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Asn Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
 165 170 175
 Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Ile Leu His Trp Val Lys
 180 185 190

 Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr
 195 200 205
 Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 210 215 220
 Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Cys Ser Met Ile Thr Thr
 245 250 255
 Ala Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 260 265 270
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 305 310 315 320
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 325 330 335

 Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
 340 345 350
 Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
 355 360 365
 Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg
 370 375 380

